

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-272988

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)11月27日

C 12 P 21/00

6712-4B

C 12 N 1/14  
15/00

D-6712-4B

7115-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全33頁)

⑮ 発明の名称 アスペルギルス オリザにおけるタンパク生成物の製造法

⑯ 特 願 昭62-60276

⑰ 出 願 昭62(1987)3月17日

優先権主張 ⑱ 1986年3月17日 ⑲ デンマーク(DK) ⑳ 1226/86

㉑ 発 明 者 エスパー ボエル デンマーク国, 2840 ホルテ, リュングバゲベイ 25

㉒ 発 明 者 トベー クリステンセン デンマーク国, 2800 リュンクビュ, 1. テーホー. ポー  
ン レバーデン 10

㉓ 発 明 者 ヘレ ファブリシウス デンマーク国, 3540 リュンゲ, ステンデュツセベイ 12  
ウオルデケ

㉔ 出 願 人 ノボ インダストリ デンマーク国, 2880 バグスバエルト, ノボ アレ (番地  
アクティーゼルスカブ なし)

㉕ 代 理 人 弁理士 齊 木 朗 外4名

明細書の添付(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発明の名称

アスペルギルス オリザにおけるタンパク  
生成物の製造法

2. 特許請求の範囲

1. アスペルギルス オリザ (*Aspergillus  
oryzae*) におけるタンパク生成物の発現方法であ  
って、

(a) アスペルギルス オリザ (*Aspergillus  
oryzae*) 宿主のゲノム中に1個以上のコピーを組  
込み可能であり且つ遺伝子発現を促進する機能を  
暗号化するDNA配列と、形質転換細胞の選択に  
好適なマーカーと、所望なタンパク生成物を暗号  
化するDNA配列とを有する組換えDNAクロー  
ニングベクター系を提供し、

(b) 選定された選択マーカー用の機能遺伝子を  
有しないアスペルギルス オリザ (*Aspergillus  
oryzae*) を工程(a)からの組換えDNAクローニ  
ングベクター系で形質転換し、次いで

(c) 形質転換したアスペルギルス オリザ

(*Aspergillus oryzae*) 宿主を適当な培養基中で培  
養する工程から成る方法。

2. 遺伝子発現を促進する機能を暗号化する  
DNA配列が、プロモーターと、転写開始部位と、  
転写ターミネーターおよびポリアダニル化機能を  
有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. プロモーターに対して、上流活性化配列が  
先行する、特許請求の範囲第2項記載の方法。

4. 選択マーカーが、A. ニドランス (*nidulans*)  
または A. ニガー (*niger*) *argB*、A. ニドランス  
(*nidulans*) *trpC*、A. ニドランス (*nidulans*)  
*amdS*、ニューロスボラ クラザーエ (*Neurospora  
crassa*) *Pyr4* またはDHFRから誘導される、特  
許請求の範囲第1項記載の方法。

5. 選択マーカーが A. ニドランス (*nidulans*)  
または A. ニガー (*niger*) から誘導される *ArgB* 遺  
伝子または A. ニドランス (*nidulans*) から誘導さ  
れる *amdS* 遺伝子である、特許請求の範囲第4項記  
載の方法。

6. プロモーターおよび上流活性化配列がアミ

ラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼまたは解糖酵素のような細胞外あるいは細胞内タンパクを暗号化する遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第3項記載の方法。

7. プロモーターおよび上流活性化配列が、A. オリザ(oryzae) TAKAアミラーゼ、リゾムコールマイヘイ(Rhizomucor miehei) アスパラギン酸プロテナーゼ、A. ニガー(niger) 中性 $\alpha$ -アミラーゼ、A. ニガー(niger) グルコアミラーゼまたはリゾムコールマイヘイ(Rhizomucor miehei) リパーゼについての遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第6項記載の方法。

8. プロモーターがA. oryzae TAKAアミラーゼプロモーターまたはその機能性部分である、特許請求の範囲第7項記載の方法。

9. プロモーターおよび上流活性化配列が以下の配列

GTCCAGCG ATTCCGAATA CGAGGCCTGA TTAATGATTA  
CATACGCCCTC CGGGTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT  
CAGCGCCTAA AACGCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA

AATCACAGTC GTCCCCGCTA TTGTCTGCA GAATGCAATT  
TAAACTCTTC TCGGAATCGC TTGGATTCCC CCGCCCTAGT  
CGTAGAGCTT AAAGTATGTC CTTGTGCGAT CGGATGTATC  
ACAACATATA AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGC  
ATAGCAACCG ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG  
AACAAATAAC CCCACAG

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する、特許請求の範囲第8項記載の方法。

10. プロモーターおよび上流活性化配列が以下の配列

AGATCTGCCC TTATAAATCT CCTAGTCTGA TCGTCGACGC  
ATTCCGAATA CGAGGCCTGA TTAATGATTA CATACGCCCTC  
CGGGTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT CAGCGCCTAA  
AACGCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA GTTAGCAATCT  
ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT CGCAGTCCCG  
ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC TGATTAAGG  
TGCCGAACCA GCTATAAATG ATATAACAAT ATTAAGCAT  
TAATTAGAGC AATATCAGGC CGCGCAGCAA AGGCAACTTA  
AAAAGCGAAA CGGCTCTACT AAACAGATTA CTTTGAATA

GTTAGAATCT ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT  
CGCAGTCCCG ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC  
TGATTAAGG TGCCGAACCA GCTATAAATG ATATAACAAT  
ATTAAGCAT TAATTAGAGC AATATCAGGC CCGGCACGAA  
AGGCAACTTA AAAAGCGAAA CGGCTCTACT AAACAGATTA  
CTTTGAAAA AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT  
TATTAAGCGC CGAAATCAGC CAGATAAAGC CATACAGGCA  
GATAGACCCTC TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGCGCGGCTC  
CATCTAAATG TTCTGGCTCT GGTGTACAGG GGCATAAAAT  
TACGCACTAC CCGAATCGAT AGAAGTACTC ATTTTATAT  
AGAAGTCAGA ATTCATAGTG TTTTGCATCAT TTTAAATTTT  
TATATGGCGG GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC GCGGCGAACT  
CGCTTACCGA TTACGTTAGC GCTGATATTT ACGTCAAAAT  
CGTCAAGCGA TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCGGGAAG  
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCTTCAGC GAGAAACCCC  
AGCGTCCACA TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCATCG  
GAGGCACCAT CCAATTAGAA GCAGCAAGC GAAACAGCCC  
AAGAAAAAGC TCGGCGGCTC GGGCTTTTCT GCAACCGTGA  
TCACGGGCAG CGATCCAACC AACACCCTCC AGAGTCACTA  
CGGCGCGAAA TTTAAAGGCA TTAATTTCCA CTCACCACA

AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT TATTAAGCGC  
CGAAATCAGC CAGATAAAGC CATACAGGCA GATAGACCCTC  
TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGCGCGGCTC CATCTAAATG  
TTCTGGCTCT GGTGTACAGG GGCATAAAAT TACCCACTAC  
CGGAATCGAT AGAAGTACTC ATTTTATAT AGAAGTCAGA  
ATTCATAGTG TTTTGCATCAT TTTAAATTTT TATATGGCGG  
GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC GCGGCGAACT CGCTTACCGA  
TTACGTTAGC GCTGATATTT ACGTCAAAAT CGTCAAGGGA  
TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCGGGAAG TCAACAGCAT  
CCAAGCCCAA GTCTTCAGC GAGAAACCCC AGCGTCCACA  
TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCATCG GAGGCACCAT  
CCAATTAGAA GCAGCAAGC GAAACAGCCC AAGAAAAAGC  
TCGGCGGCTC GGGCTTTTCT GCAACCGTGA TCACGGGCAG  
CGATCCAACC AACACCCTCC AGAGTCACTA GGGCGCGAAA  
TTTAAAGGCA TTAATTTCCA CTCACCACA AATCACAGTC  
GTCCCGGCTA TTGTCTGCA GAATGCAATT TAACTCTTC  
TGCGAATCGC TTGGATTCCC CCGCCCTAGT CGTAGAGCTT  
AAAGTATGTC CTTGTGCGAT CGGATGTATC ACAACATATA  
AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGG ATAGCAACCG  
ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG AACAAATAAC

CCCACAGAAG GCATT

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する、特許請求の範囲第8項記載の方法。

11. 特許請求の範囲第10項記載の配列に対して、プラスミドpTAKA 17における位置0~1.05の1.05kb無配列上流領域が先行する、特許請求の範囲第10項記載の方法。

12. ベクター系が更に培養基に発現した生成物の分泌に備えたプレ領域を有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

13. プレ領域がアスペルギルス(*Aspergillus*)種からのグルコアミラーゼあるいはアミラーゼ遺伝子、バシラス(*Bacillus*)種からのアミラーゼ遺伝子、リゾムコール マイヘイ(*Rhizomucor miehei*)からのリパーゼあるいはプロテイナーゼ遺伝子、*S. セレビゼ(cerevisiae)*からの $\alpha$ -因子の遺伝子または仔牛のプロキモシン遺伝子から誘導される、特許請求の範囲12項記載の方法。

14. プレ領域がA. オリザ(*oryzae*) TAKAアミ

ラーゼ、A. ニガー(*niger*)中性 $\alpha$ -アミラーゼ、A. ニガー(*niger*)の酸に安定な $\alpha$ -アミラーゼ、B. リケニフォルミス(*licheniformis*)、 $\alpha$ -アミラーゼ、バシラス(*Bacillus*) NC18 11837マルトース原性アミラーゼ、B. ステロサーフィラス(*stearothermophilus*) $\alpha$ -アミラーゼまたはB. リケニホルミス スブチリシン(*licheniformis subtilisin*)の遺伝子から誘導される、特許請求の範囲第13項記載の方法。

15. プレ領域が以下の配列

ATCATGCTCGCGTGGTCTCTATTTCTGTACGGCCTTCAG  
MetMetValAlaTrpTrpSerLeuPheLeuTyrGlyLeuGln

GTCCGGCCACCTGCTTTGGCT  
ValAlaAlaProAlaLeuAla

を有するTAKA-アミラーゼプレ領域である、特許請求の範囲第14項記載の方法。

16. ベクター系が2個のベクターから成り、一方が選択マーカーを有し、他方は遺伝子発現を促進する機能を暗号化するDNA配列と所望なタン

パク生成物を暗号化するDNA配列を有する、特許請求の範囲第1項記載の方法。

17. アスペルギルス オリザ(*Aspergillus oryzae*)におけるタンパク生成物の産生法であり、特許請求の範囲第1項記載の組換えDNAクローニングベクター系で形質転換されるアスペルギルス オリザ(*Aspergillus oryzae*)株を適当な培養基で培養して、生成物を培養基から回収する方法。

18. アスペルギルス(*Aspergillus*)におけるタンパク生成物の発現に好適なプロモーターであって、TAKA-アミラーゼプロモーターまたは上流活性化配列が任意に先行する上記プロモーターの機能的部分であることを特徴とするプロモーター。

19. 以下の配列

AGATCTGCCC TTATAAATCT CCTAGTCTCA TCGTCGACCC  
ATTCCGAATA CGAGCCCTCA TTAATGATTA CATACGCCTC  
CGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT CAGCGCCTAA  
AACGCCCTTAT ACAATTAAGC ACTTAAAGAA GTTAGAATCT  
ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT CCGAGTCCCG  
ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC TGATTAAGG

TGCCGAACGA GCTATAAATC ATATAACAAT ATTAAAGCAT  
TAATTAGACC AATATCAGCC CGCGCACGAA AGGCAACTTA  
AAAACCGAAA GCGCTCTACT AAACAGATTA CTTTGA AAAA  
AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT TATTAAGCCG  
CGAAATCAGG CAGATAAAGC CATACAGGCA CATAGACCTC  
TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGGCGCGCTC CATCTAAATG  
TTCTGGCTCT GGTGTACAGG GGCATAAAAT TACCGACTAC  
CCGAATCCAT AGAACTACTC ATTTTATAT AGAAGTCAGA  
ATTATAGTC TTTTGATCAT TTTAAATTTT TATATGGCGG  
GTGGTGGGCA ACTCGCTTCC GCGGGCAACT CGCTTACCGA  
TTACGTTAGG GCTCATATTT ACCTGAAAAT CGTCAAGCGA  
TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAAG TCAACAGCAT  
CCAAGCCCAA GTCCTTCACG GAGAAACCCC AGCCTCCACA  
TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCATCG GACCCACCAT  
CCAATTAGAA GCAGCAAAGC GAAACAGCCC AAGAAAAAGC  
TCCGCCCGTC GGCCTTTTCT GCAACGCTGA TCACCGGCAG  
CGATCCAACC AACACCCCTCC AGAGTGACTA GGGGCGGAAA  
TTTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCACCACA AATCACAGTC  
GTCCCGGTA TTGCTCTGCA GAATGCAATT TAAACTCTTC  
TCCGAATCCG TTGGATTCCC CCCCCCTAGT CGTAGAGCTT

AAAGTATGTC CCTTCTCGAT GCGATGTATC ACAACATATA  
AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGG ATAGCAACCC  
ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG AACAAATAAC  
CCCACAGAAG GCATTT

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する  
特許請求の範囲第18項記載のプロモーターおよ  
び上流活性化配列。

20. 上流活性化配列に対して、プラスミド  
pTAKA 17における位置0~1.05の1.05kb無配列上  
流領域が先行する、特許請求の範囲第19項記載  
のプロモーターおよび上流活性化配列。

21. 以下の配列

GTCGACGC ATTCGGAATA CGAGCCCTCA TTAATGATTA  
CATACGCCCTC CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CCAGCCAGTT  
CAGCGCCCTAA AACCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA  
GTTAGAATCT ACCGTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT  
CGCAGTCCCG ATTGCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC  
TGATTAAGG TGCCGAACCA GCTATAAATG ATATAACAAT  
ATTAAGCAT TAATTAGAGC AATATCAGGC CGCGCACGAA

ATAGCAACCG ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG  
AACAAATAAC CCCACAG

または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する  
特許請求の範囲第19項記載のプロモーターおよ  
び上流活性化配列。

### 3. 発明の詳細な説明

〔発明の技術分野〕

本発明はアスペルギルス オリザ(*Aspergillus oryzae*)におけるタンパク生成物の発現法、組換えDNAベクター、アスペルギルス(*Aspergillus*)用プロモーターおよび形質転換された菌類に関する。

〔従来の技術〕

今日までに、組換えDNA技術によるポリペプチドまたはタンパクを生産するため数多くの方法が開発されてきた。主な興味は細菌および酵母に集中されてきたのであり、例えば*E. coli*、*Bacillus subtilis* および *Saccharomyces cere-*

AGGCAACTTA AAAAGCGAAA GCGCTCTACT AAACAGATTA  
CTTTTGA AAAA AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT  
TATTAAGCGC CGAAATCAGG CAGATAAAGC CATACAGGCA  
CATAGACCTC TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGCGCGGCTC  
CATCTAAATG TTCTGGCTGT GGTGTACAGG GGCATAAAAT  
TACGCACTAC CCGAATCGAT ACAACTACTC ATTTTATAT  
AGAAGTCAGA ATTCATAGTG TTTTGATCAT TTTAAATTTT  
TATATGGCGG GTGCTGGCCA ACTCGCTTGC GCGGGCAACT  
CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTGATATTT ACCTGAAAAA  
CGTCAAGGGA TGCAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAAG  
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCCTTCAGG CAGAAAACCC  
AGCGTCCACA TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCATCG  
GACGCACCAT CCAATTAGAA GCAGCAAAGC GAAACAGCCC  
AAGAAAAAGG TCGGCCCGTC GGCCTTTTCT CCAACCGTGA  
TCACGGGCGAG CGATCCAACC AACACCCCTCC AGAGTGACTA  
GGGGCGGAAA TTTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCACCACA  
AATCAGAGTC GTCCCCGTA TTGCTCTGCA GAATGCAATT  
TAAACTCTTC TGCGAATCGG TTGGATTCCC CGCCCCTAGT  
CGTAGAGCTT AAAGTATGTC CCTTGTGGAT CGGATGTATC  
ACAACATATA AATACTAGCA AGCGATGCCA TGCTTGGAGC

*visiae*は例えば発現および選択系に関して詳細に特徴化されているものである。

上記の微生物のほかに、*Aspergillus niger* のような糸状菌は、詳細に特徴化されている組換えDNAベクター用の宿主微生物として有望な候補であり、酵素を商業的に生産するのに広範囲に用いられている微生物である。形質転換された宿主微生物から形質転換細胞を選択できる選択マーカーが用いられる形質転換系の開発に、特に努力が集中されてきた。

過去数年間に*Aspergillus nidulans*の形質転換のための各種選択マーカーが報告され、菌の細胞分化を制御する遺伝学的および分子学的方法を研究する目的で糸状菌*Aspergillus nidulans*の組込み形質転換の手法が近年になり開発されてきた。

*A. nidulans*の形質転換は、*Neurospora crassa* pyr-4 遺伝子 (Ballance, D.J. ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 第112巻、(1983年)、284~289頁)、*A. nidulans* andS遺伝子 (Tilburn, J.G. ら、Gene、第26巻、(1983年)、205~221頁)。

A. nidulans *trpC*遺伝子(Yelton, M.H.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 第81巻、(1984年)、1470~1474頁)およびA. nidulans *argB*遺伝子(John, H.A.およびPeberdy, J.; Microb. Technol., 第6巻、(1984年)388~389頁)を含むプラスミドを用いて説明されてきた。形質転換するDNAは、比較的低い頻度(典型的には1000個未満の形質転換体/1  $\mu$ g のDNA)で宿主ゲノムに組込まれることが分かった。

ごく最近に、A. nidulansの*amdS*遺伝子を用いるAspergillus nigerの形質転換が報告され(Kelly, J.H.とHynes, M.J.; ENBO Journal, 第4巻、(1985年)、475~479頁)、*amdS*は単一の窒素源としてのアセタミド上では強力には成長できないAspergillus nigerの形質転換に使用される有力な選択マーカーであることが示された。A. nidulansの*argB*遺伝子を用いるAspergillus nigerの形質転換も、最近報告された(Saxton, F.P.ら、Gene, 第37巻、(1985年)、207~214頁)。

以下余白

の形質転換に用いたマーカー遺伝子を使用することによって、所望なタンパク生成物を暗号化するDNAで形質転換したA. oryzae株の選択が可能である。これら前者の菌類とA. oryzaeとの系統発生的距離(Raper, K.B.およびFennell, D.L., (1985年)The Genus Aspergillus)のために、これはまったく予知されないものであった。

本発明の第一の見地によれば、

(a) アスペルギルス オリザ(Aspergillus oryzae)宿主のゲノム中に1個以上のコピーを組み込み可能であり且つ遺伝子発現を促進する機能を暗号化するDNA配列と、形質転換細胞の選択に好適なマーカーと、所望なタンパク生成物を暗号化するDNA配列とを有する組換えDNAクローニングベクター系を提供し、

(b) 選定された選択マーカー用の機能遺伝子を有しないAspergillus oryzaeを工程(a)からの組換えDNAクローニングベクター系で形質転換し、次いで

(c) 形質転換したAspergillus oryzae宿主を選

〔発明が解決しようとする問題点〕

糸状菌Aspergillus oryzaeにおける異種タンパクの発現のための系は、主として、この菌における遺伝子発現の制御法が十分には知られておらず且つクローニングベクター上に好適な選択可能な遺伝子マーカーが欠如していることにより、これまでは開発されなかった。

〔問題点を解決するための手段、発明の作用および効果〕

本発明によれば、上記の形質転換技法を用いて、異種タンパクを高水準で発現させまたはAspergillus oryzaeにおける同種タンパクの産生を増進させることができる。

本明細書において用いられる「異種タンパク」という表現はA. oryzaeによっては産生されないタンパクを意味し、一方「同種タンパク」という表現はA. oryzae自体によって産生されるタンパクを意味する。

更に具体的には、A. nigerおよびA. nidulans

当な培養基中で培養する工程から成るAspergillus oryzaeにおいてタンパク生成物の発現法が提供される。

本発明の第二の見地によれば、Aspergillus、具体的にはAspergillus oryzaeおよびAspergillus nigerにおけるタンパク生成物の発現に極めて効果的なプロモーターであって、TAKA-アミラーゼプロモーターまたは任意に上流活性化配列が先行する上記プロモーターの機能的部分として特徴化されるものが提供される。

本発明の第三の見地によれば、Aspergillus oryzaeにおけるタンパク生成物の産生法であって、上記のように組換えDNAクローニングベクターを用いて形質転換したAspergillus oryzae株を適当な培養基中で培養し、生成物を培養基から回収する方法が提供される。

使用した形質転換法は、A. nidulansの形質転換法の変法(Ballance, D.J.ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 第112巻、(1983年)、284~289頁、Tilburn, J.G.ら、Gene, 第26巻、(1983年)、

205~221頁)、Yellon, M.H.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、第81巻、(1984年)、1470~1474頁)および*A. niger*の形質転換についてのBuxtonらの方法、(Gene、第37巻、(1985年)、207~214頁)に類似の方法であった。本発明の方法では、*Aspergillus oryzae*は、宿主株のゲノム中に組込むことができるが、形質転換前は宿主株に有しない選択マーカーを含むベクター系で形質転換される。

好ましい選択マーカーはargB(*A. nidulans*または*A. niger*)、trpC(*A. nidulans*)、andS(*A. nidulans*)またはpyr4(*Neurospora crassa*)遺伝子、またはDHFR(ジヒドロフォレートレダクターゼまたはその変異株)遺伝子である。更に好ましい選択マーカーはargBまたはargS遺伝子である。野生型*A. oryzae*株は通常はargB<sup>+</sup>である(すなわち、argB遺伝子が*A. oryzae*において機能的である)。argBを選択マーカーとして選択する場合には、このマーカーに対して遺伝子に欠損を有する*A. oryzae*のargB変異株を宿主株として用いなければ

ならない。*A. oryzae*のargB変異株はF.P. Duxtonらが報告したのと同様にして調製することができる(Gene、第37巻、(1985年)、207~214頁)。argB変異株はオルニチントランスカルバミラーゼ遺伝子に欠損を有する変異株として定義される。他方、andS遺伝子は、野生型*A. oryzae*株がこの遺伝子を含まないので、この野生株の形質転換の選択マーカーとして用いることができる。

遺伝子配列を促進する機能を暗号化するDNA配列は、典型的にはプロモーター、転写ターミネーターおよびポリアダニル化シグナルである。

当業界において周知のように上流活性化配列およびエンハンサー配列が先行することのあるプロモーターは*Aspergillus oryzae*において強力な転写活性を示すことができる如何なるDNA配列であってもよく、アミラーゼ、グルコアミラーゼ、プロテアーゼ、リパーゼ、セルラーゼおよび解糖酵素のような細胞外および細胞内タンパクのいずれをも暗号化する遺伝子から誘導することができる。好適なプロモーターは*A. oryzae* TAKAアミラ

ーゼ、*Rhizomucor miehei* アスバラギン酸プロテイナーゼ、*A. niger* グルコアミラーゼ、*A. niger* 中性 $\alpha$ -アミラーゼ、*A. niger* 酸安定 $\alpha$ -アミラーゼおよび*Rhizomucor miehei* リパーゼについての遺伝子から誘導することができる。解糖酵素の遺伝子からのプロモーターの例は、TPI、ADHおよびPGKである。

本発明による好ましいプロモーターは、*A. oryzae* TAKA-アミラーゼプロモーターである。TAKAアミラーゼは周知の $\alpha$ -アミラーゼ(Todaら、Proc. Japan Acad.、第58巻、シリーズB(1982年)、208~212頁)である。プロモーター領域を暗号化するDNAは、TAKA-アミラーゼゲノム性クローンから誘導した。プロモーターおよびプロモーターの上流の領域の配列を、アレ領域およびTAKA-アミラーゼについての構造遺伝子の5'末端と共に第1図に示す。

実施例2に更に詳細に説明されるように、アレ領域およびプロモーターおよび上流活性化配列を含むTAKA-アミラーゼを暗号化するDNA配列は、

*A. oryzae* myceliumから誘導され、BamHIを消化したpBR322に挿入されて、プラスミドpTAKA 17を生成した(第2図を参照されたい)。pTAKA 17 *A. oryzae*から誘導されたDNAは5.5 kb BamHI / Sau 3AI-BamHI / Sau 3AI フラグメントとして示され、プロモーターおよび上流活性化配列は位置0で開始する2.1 kbフラグメントを表わす。Bgl II部位までのプロモーターおよび上流活性化配列の確立されたDNA配列を、第1図に示す。プロモーターは、TAKA-アミラーゼアレ配列のMet(1)コドンに先行するヌクレオチド-1で終了する。アレ配列を暗号化するヌクレオチド配列は63碱のヌクレオチドから構成され、成熟TAKA-アミラーゼはヌクレオチド64に対応する位置から開始する。

pTAKA 17から、プロモーターに対して上流の配列を含む全プロモーター配列またはその機能的部分は、当業者に公知の手段によって誘導することができる。プロモーター配列は、プロモーター配列を、例えば所望なタンパク生成物またはことな

るアレ領域(シグナルペプチド)を暗号化する遺伝子のような他のDNAとの連結を促進する特異的な制限部位を導入するために、リンカーを備えていてもよい。

本発明による方法では、(Sal I 部位の開始を表わす)ヌクレオチド-1144(第1図を参照されたい)からヌクレオチド-10の配列を、プロモーター領域の十分に機能する部分の一例として使用した。本発明のもう一つの態様では、ヌクレオチド-1178から-1までのヌクレオチド配列は、pTAKA 17からの未だ配列されていない1.05kbフラグメントが先行した。各種のフラグメントを使用できることは、当業者にとって明らかである。

本発明の一態様によれば、プロモーターおよび上流活性化配列は、第1図におけるヌクレオチド-1144からヌクレオチド-10の配列を表わす下記の配列または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する。

以下余白

```

GTCCACGC ATTCCGAATA CGAGGCCTGA TTAATGATTA
CATACGCCTC CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT
CAGCCGCTAA AACGCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA
GTTAGAATCT ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT
CGCAGTCCCC ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC
TGATTAAGG TCCCGAACGA GCTATAAATG ATATAACAAT
ATTAAGCAT TAATTAGAGC AATATCAGCC CGCCGACGAA
AGGCAACTTA AAAAGCGAAA CGCCTCTACT AAACAGATTA
CTTTTGAAAA AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT
TATTAAGCCG CGAAATCAGG CAGATAAAGC CATACAGGCA
GATAGACCTC TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGCGCGGCTC
CATCTAAATG TTCTGGCTGT GGTGTACAGG GGCATAAAAT
TACGCACTAC CGGAATCGAT AGAACTACTC ATTTTATAT
AGAAGTCAGA ATTCATAGTG TTTTGATCAT TTTAAATTTT
TATATGCGCG GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC CGGGGCAACT
CGCTTACCGA TTACGTTAGG GCTCATATTT ACGTCAAAAT
CGTCAAGGCA TCGAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAAG
TCAACAGCAT CCAAGCCCAA GTCCCTCAGG GAGAAACCCC
AGCGTCCACA TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCATCG
GACGCACCAT CCAATTAGAA GCAGCAAAAG GAAACAGCCC

```

```

AAGAAAAAGG TCGGCCCGTC GGCCTTTTCT GCAACGCTGA
TCACGGGCAG CGATCCAACC AACACCCCTCC AGACTGACTA
GGGGCGGAAA TTTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCACCACA
AATCACAGTC GTCCCCGGTA TTGTCCTGCA GAATGCAATT
TAAACTCTTC TCGGAATCGG TTGGATTCCC CGCCCTAGT
CGTAGAGCTT AAAGTATGTC CCTTGTGGAT CGCATGTATC
ACAACATATA AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGG
ATAGCAACCG ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG
AACAATAAAC CCCACAG

```

もう一つの態様によれば、プロモーターおよび上流活性化配列は、第1図におけるヌクレオチド-1178から-1までの配列を表わす下記の配列または機能的に等価なヌクレオチド配列を有する。

```

AGATCTGCCC TTATAAATCT CCTAGTCTGA TCCTCGACGC
ATTCCGAATA CGAGGCCTGA TTAATGATTA CATACGCCTC
CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC CGAGCCAGTT CAGCGCCTAA
AACGCCCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA GTTAGAATCT
ACGCTTAAAA AGCTACTTAA AAATCGATCT CGCAGTCCCC

```

```

ATTCCGCTAT CAAAACCACT TTAATCAAC TGATTAAGG
TCCCGAACGA GCTATAAATG ATATAACAAT ATTAAGCAT
TAATTAGAGC AATATCAGCC CGCCGACGAA AGGCAACTTA
AAAAGCGAAA CGCCTCTACT AAACAGATTA CTTTGA AAA
AGGCACATCA GTATTTAAAG CCCGAATCCT TATTAAGCCG
CGAAATCAGG CAGATAAAGC CATACAGGCA GATAGACCTC
TACCTATTAA ATCGGCTTCT AGCGCGGCTC CATCTAAATG
TTCTGGCTGT GGTGTACAGG GGCATAAAAT TACGCACTAC
CGGAATCGAT AGAACTACTC ATTTTATAT AGAAGTCAGA
ATTCATAGTG TTTTGATCAT TTTAAATTTT TATATGCGCG
GTGGTGGGCA ACTCGCTTGC CGGGGCAACT CGCTTACCGA
TTACGTTAGG GCTCATATTT ACGTCAAAAT CGTCAAGGCA
TGAAGACCA AAGTAGTAAA ACCCCGGAAG TCAACAGCAT
CCAAGCCCAA GTCCCTCAGG GAGAAACCCC AGCGTCCACA
TCACGAGCGA AGGACCACCT CTAGGCATCG GACGCACCAT
CCAATTAGAA GCAGCAAAAG GAAACAGCCC AAGAAAAAGG
TCGGCCCGTC GGCCTTTTCT CCAACCTGA TCACGGGCAG
CGATCCAACC AACACCCCTC AGAGTGACTA GGGGCGGAAA
TTAAAGGGA TTAATTTCCA CTCACCACA AATCACAGTC
GTCCCCGGTA TTGTCCTGCA GAATGCAATT TAAACTCTTC

```

TGCGAATCGC TTGGATTCCC CGCCCTAGT CGTAGAGCTT  
 AAAGTATGTC CCTTGTCCAT CGCATGTATC ACAACATATA  
 AATACTAGCA AGGGATGCCA TGCTTGGAGC ATAGCAACCG  
 ACAACATCAC ATCAAGCTCT CCCTTCTCTG AACAAATAAC  
 CCCACAGAAG GCATTT.

本発明のもう一つの見地によれば、後者の配列では、pTAKA 17からの1.05kb未配列の上流領域(第2図における位置0~1.05)が先行してもよい。

ターミネーターおよびポリアデニル化配列はプロモーターと同じ源から誘導することができる。エンハンサー配列を構造中に挿入してもよい。

発現した生成物は細胞の分裂を要する細胞内に蓄積させて、生成物を単離することができる。この付加的工程を回避し且つ細胞内で発現した生成物の可能な分解量を最少限にするには、生成物を細胞から分泌するのが好ましい。この目的のため、所望な生成物の遺伝子は、発現した生成物を細胞の分泌経路内への効果的に向けるアレ領域を有する。自然に起こるシグナルまたはリーダーペプチ

ドまたはその機能的部分あるいは分泌を行う合成配列であることができるこのアレ領域は、一般的には分泌の際に所望な生成物から開裂して、培養液から単離する準備のできた成熟生成物を残す。

このアレ領域は、如何なる有機物源からのものであっても分泌されるタンパクの遺伝子から誘導することができる。

本発明によれば、アレ領域はAspergillus 種からのグルコアミラーゼまたはアミラーゼ遺伝子、Bacillus種からのアミラーゼ遺伝子、Rhizomucor mieheiからのリパーゼまたはプロテイナーゼ遺伝子、S. cerevisiae からの $\alpha$ -因子の遺伝子または仔牛プロキモシン遺伝子から誘導することができる。更に好ましくは、アレ領域はA. oryzae TAKAアミラーゼ、A. niger中性 $\alpha$ -アミラーゼ、A. niger酸安定 $\alpha$ -アミラーゼ、B. licheniformis  $\alpha$ -アミラーゼ、Bacillus NCIB 11837 からのマルトース原性アミラーゼ、B. stearotheophilus またはB. licheniformis subtilisinから誘導される。有効なシグナル配列は、A. oryzaeTAKA -

アミラーゼシグナル、Rhizomucor miehei アスバリン酸プロテイナーゼシグナルおよびRhizomucor mieheiリパーゼシグナルである。

TAKA-アミラーゼシグナルは下記の配列を有する。

ATGATCGCTCGCGTGGTGGTCTCTATTCTGTACGGCCTTCAG  
 MetMetValAlaTrpTrpSerLeuPheLeuTyrGlyLeuGln

GTCGCGGCACCTGCTTTGGCT  
 ValAlaAlaProAlaLeuAla

プロモーターおよびターミネーター配列に機能的に連結した所望な生成物の遺伝子は、選択マーカーを含むベクターに組込むことができ、または宿主株のゲノム中に組込むことができる別個のベクターまたはプラスミド上に置いてもよい。本明細書で用いる「ベクター系」という表現は単一ベクターまたはプラスミドまたは宿主ゲノム中に組込まれる全DNA情報を含む2種類以上のベクターまたはプラスミドを包含する。ベクターまたはプラスミドは、線状または閉じた円形分子であってもよい。本発明の好ましい態様によれば、A.

oryzaeは2個のベクターであって、一つは選択マーカーを含み、もう一つは宿主株に導入される残りの異種DNAから成り、プロモーター、所望な生成物および転写ターミネーターの遺伝子およびポリアデニル化配列を含むもので共形質転換される。

通常は、A. oryzae 形質転換体は安定であり、選択マーカーの不在で培養することができる。形質転換体が不安定になる場合には、選択マーカーを用いて培養の際に選択してもよい。形質転換細胞を、次に問題のマーカーに対応する選択圧で培養する。

本発明はA. oryzae において多種多様なポリペプチドまたはタンパク生成物を高収率で製造する方法を提供する。A. oryzae は長年にわたり例えばTAKA-アミラーゼ酵素およびタンパク分解酵素の生産に商業的規模で用いられてきており、従ってこの微生物の醗酵技術は十分に開発されており、この微生物は食品工業において使用されることが証明されている。本発明は、原則として如何なる



ポリペプチドまたはタンパク生成物でも高収量での工業的生産に *A. oryzae* の使用可能性を提供する。かかる生成物の例はキモシンまたはプロキモシンおよび他のレンネット、プロテアーゼ、アミログルコシダーゼ、*Aspergillus* からの酸安定アミラーゼ、菌のリパーゼまたは原生生物のリパーゼおよび熱に安定な細菌または菌のアミラーゼである。

本発明をプロキモシン、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、TAKA-アミラーゼおよび *Rhizomucor miehei* からのリパーゼの生産によって説明する。これらの酵素の遺伝子は、下記に更に詳細に説明するように、cDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーから得た。

#### (実施例)

以下の実施例において出発物質として使用したプラスミドは次の通りである。

- p285 (ATCC No. 20881)  
PCAMG91 Boelら、EMBO Journal、第3巻、(1984年)、1581~1585頁。

ATCC 9578、ATCC 14488~11491、  
ATCC 11601およびATCC 12892、

*E. coli* MC1000 (Casabadian, M.J. および Cohen, S.N., J. Mol. Biol., 第138巻、179~207頁)(NCIB 11958)。

*Rhizomucor*  
*miehei* CBS 370.85

#### 実施例1

##### プロキモシン遺伝子を含むプラスミド285'proCの調製

ブレアロキモシン遺伝子を仔牛の胃のcDNAライブラリーから単離し、G-CテイリングによってpBR322の *Pst*I 部位に挿入して(Chirgwinら、Biochemistry、第18巻、(1979年)、5294頁およびTruelsenaら、Nucleic Acids Res., 第6巻、(1979年)、3081頁)、pR26を得た。pUC9を *Sal*I で切断し、切断をクレノーポリメラーゼで満たし、T4リガーゼで連結した。生成するプラスミドを *Bam*HI - *Eco*RI で切断して、2.7kbの大きなフラグメントをプロキモシン遺伝子のN末端を含む

- pIC19R Marsh ら、Gene、第32巻、(1984年)、481~485頁。  
pSal43 Berse ら、Gene、第25巻、(1983年)、109~117頁、John & Peberdy、Enzyme Microb. Technol., J.M. KellyおよびM.J. Hynes、EMBO Journal、第4巻(1985年)、475~479頁。

- pBR322 Bolivar, F. ら、Gene、第2巻(1977年)、95~113頁。  
pBR327 Covarrubias, L. ら、Gene、第13巻、(1981年)、25~35頁。

pUC9、pUC13

およびpUC19 Vieiraら、Gene、第19巻、(1982年)、259~268頁、および Messing, Meth. in Enzymology、第101巻、(1983年)、20~27頁。

使用した菌株は次の通りである。

- A. niger* ATCC 1015、ATCC 10582  
*A. oryzae* ATCC 20423、IFO 4177、ATCC 1011、

pR26からの0.47kb *Bam*HI - *Eco*RI フラグメントと連結し、pUC9'を作った。pUC9'は、プロキモシン遺伝子のN末端に *Hind*III 部位を含む。pUC13を *Bam*HI - *Nar*I で切断して、*Nar*I - *Xba*I と大きなそれぞれの小型フラグメントをプロキモシン遺伝子のC末端を含むpR26の0.64kb *Xba*I - *Bcl*I フラグメントと連結して、プラスミドpUC13'を得た。pUC13'は、プロキモシン遺伝子のC末端に *Xba*I 部位を含む。pUC13'の0.65kb *Xba*I - *Xba*I フラグメントを、pUC9'の0.48kb *Hind*III - *Xba*I およびp285の1.1kb *Xba*I - *Hind*III フラグメントと連結して、第3図に示されるようにプロキモシン遺伝子を含むプラスミドp285'proCを生成させた。

#### 実施例2

##### *A. oryzae* TAKA-アミラーゼA遺伝子のクローニング

じゃがいも澱粉上で成長させた *A. oryzae* Hw 325から、Kaplanらの方法(Biochem. J., 第183巻、(1979年)、181~184頁)によって、mRNA

を調製した。TAKA-アミラーゼ遺伝子の1050bpを含む部分cDNAクローンを、mRNAをTAKA-アミラーゼにおけるアミノ酸295~299についての暗号化配列に相補的な4-マー・オリゴヌクレオチド混合物

A A A A  
5'CG TT TC TC TT 3'(NOR-168)  
G G G G

で特異的に感作することによって得た(Todara, Proc. Japan Acad., 第58巻、シリーズB、(1982年)、208~212頁)。クローニング法は、Gubler & Hoffman, Gene, 第25巻、(1983年)、263~269頁記載の方法に準じた。cDNAクローンの両端および中央部での配列は、TAKA-アミラーゼのアミノ酸配列に対応する配列が存在することを示した。

#### ゲノムクローンの単離

*A. oryzae* Hw 325からの菌糸を収穫して、Boelらの上記文献に記載の*A. niger*について用いた方法に従ってDNAを調製するために加工した。Sau3Aで部分消化することによって生成した3~

10kbの制限フラグメントを、BamHIで消化して、脱リン酸化したpBR322と連結した(New England Biolabs)。50,000個の組換え体をオリゴヌクレオチドプローブNOR-168(上記)でスクリーニングして、7個がTAKA-アミラーゼを暗号化するDNAを含むことを見出した。一つのクローンをmRNA開始2.1kb上流を有するプロモーター領域を更に使用するのに選択した。プラスミドpTAKA 17についての制限マップを第2図に示す。*E. coli*株に移したpTAKA 17を1987年2月23日にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen(DSM)、Griesbachstrasse 8, D-3400, Goettingenに寄託され、受託番号DSM 4012を与えられた。DSMは1977年のブダペスト条約で認定された国際寄託当局であり、上記の条約のそれぞれ第9規則および第11規則に従って、公衆による寄託および入手の永続性を付与している。 以下本白

#### 実施例3

##### *Rhizomucor miehei* cDNA ライブラリーの構成

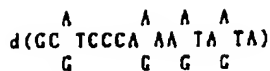
真菌類*Rhizomucor miehei*(この菌種の形態学および系統学的説明については、Shipper, M.A. A., On the genera *Rhizomucor* and *Parasitella*, Studies in mycology, Institute of the Royal Netherlands Academy of Science and Letters, 第17号(1978年)、53~71頁を参照されたい)はチーズ製造におけるミルクの凝固に広く用いられている酸プロテイナーゼ(*Rhizomucor miehei*プロテイナーゼ、以下RMPと省略する)を分泌する。*E. coli*においてこのタンパクのcDNA組換えクローンを得るために、全RNAをBoelら(EMBO J., 第3巻、1097~1102頁、1984年)およびChirgwinら(Biochemistry(Wash.), 第18巻、5294~5299、1979年)の方法によってホモゲナイズした*R. miehei* myceliumから抽出した。ポリ(A)含有RNAを、AvivとLeder(PNAS, USA, 第69巻、1408~1412頁、1972年)によって報告さ

れたオリゴ(dT)-セルロース上で親和クロマトグラフィーを2サイクル行うことによって得た。オリゴ(dT)で感作した相補性DNAを合成して、GublerとHoffman(Gene, 第25巻、263~269頁、1983年)が報告した方法に従って二重鎖とした。二重鎖を、Roychoudhuryら(Nucleic Acids Res. 第3巻、101~106頁、1978年)によって報告された方法によって、dCTPおよび末端デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼと連結した。プラスミドpBR327をPstIで線形化して、dGTPと連結した。オリゴ(dC)を連結したds cDNAを、Peacockらが記載した方法(Biochim. Biophys. Acta, 第655巻、243~250頁、1981年)によってこのオリゴ(dG)を連結したベクターにアニーリングして、*E. coli* MC1000のhadR<sup>-</sup>, M<sup>+</sup>誘導体(CasadabanとCohen, J. Mol. Biol., 第138巻、179~207頁、1980年)を形質転換して組換えクローンを生成させるのに用いた。

##### RMP特異的なcDNA組換え体の同定

16個のヘプタデカマー・オリゴデオキシシリボ

ヌクレオチド



の混合物であって、その一つがTyr-Tyr-Phe-Trp-Asp-Alaを暗号化する領域においてRMP mRNAに相補的であるもの(BechとFoltmann, *Nethmilk Dairy J.*、第35巻、275~280頁、1981年)をApplied Biosystems, Inc.製DNA合成装置上で合成し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。*Rhizomucor miehei* cDNAライブラリーからの約10,000個の*E. coli* 組換え体をMatsuda 540 号紙に移した。コロニーを、Gergenらが記載した方法によってリーシスして、固定した(*Nucleic Acids Res.*、第7巻、2115~2135頁、1979年)。フィルターを、Boelら(*EMBO J.*、第3巻、1097~1102頁、1984年)によって記載された方法によって<sup>32</sup>P-標識したRMP特異的ヘプタデカマー混合物と交雑した。フィルターの交雑と洗浄は40℃で行い、次いでインテンシファイヤー・スクリーンを用いて24時間オートラジオグ

ラフィーを行った。ミニプレブ(Miniprep)プラスミドDNAは、標準的な方法(BirnboimとDoly, *Nucleic Acids Res.*、第7巻、1513~1523頁、1979年)によって交雑するコロニーから単離し、cDNAインサートのDNA配列をMaxamとGilbertの方法(*Methods Enzymol.*、第65巻、499~560頁、1980年)によって確立した。pRMP1016は、mRNAの5'末翻訳末端の部分を含み、次いで69個の酸の長いアレプロ領域と300個のアミノ酸をPMRタンパクの成熟部分に暗号化する領域中に伸びていることを示した。pRMP1016はRMP mRNAの完全な3'末端に対応するインサートを含まなかったため、cDNAライブラリーをクローンpRMP1016からの<sup>32</sup>Pニックが翻訳された3'特異的制限フラグメントで再度スクリーニングすることによって、クローンpRMP2931を単離した。このクローンは3'末翻訳領域の部分とRMPタンパクのカルボキシ末端部分を暗号化する270塩基のトリプレットを有する開放読み込み枠を含む。それ故、pRMP1016および

pRMP2931は著しくオーバーラップしており、2個のクローンの結合した配列は、*R. miehei* アレプロRMP cDNAの配列を与える。1416個のヌクレオチドの総ては、cDNAクローニング法から生成するG:Cテイルの間に配列した。確立したDNA配列を第4aおよびb図に、RMPへの前駆体の推定アミノ酸配列と共に示す。第4aおよびb図では、水平線はcDNAライブラリーのスクリーニングに用いた合成オリゴ混合物の位置を示している。矢印は、元のRMPの成熟において加工が起こる位置を示している。ヌクレオチドは開始Metコドンにおける第一の塩基から番号を付け、アミノ酸は成熟RMPにおける第一の残基から番号を付けている。このcDNA配列から、RMPは69個のアミノ酸のプロペプチドで430個のアミノ酸の長い前駆体として合成されると結論することができる。この前駆体における推定上のシグナルペプチダーゼ加工部位(von Heijne, *Eur. J. Biochem.*、第133巻、17~21頁、1983年)は、Ala(-48)およびArg(-47)の間にあると考えら

れ、成熟RMPはGlu-1およびAla(+1)の間での自動タンパク分解性開裂によって生成する。RMPのcDNAで推定したアミノ酸配列は、以前報告された部分的アミノ酸配列(BechとFoltmann, *Nethmilk Dairy J.*、第35巻、275~280頁、1981年)と良好に一致している。

RMP cDNAを用いて更に構成作業を促進するため、次のようにしてクローンpRMP2931において同定されたTAA停止コドンに対して3'のBam I 部位にBln I リンカーを挿入した。すなわち、25 μg pRMP2931をPst I で消化してRMP cDNAを得た。このインサートを1%アガロースゲル電気泳動法で精製し、ゲルから電気溶出し、フェノールおよびクロロホルム抽出によって精製し、NaClおよびエタノールで沈澱させた。RMPの3'半分を暗号化するこのフラグメントをBam I で消化し、Bam I 付着制限部位末端を4個のdNTPと*E. coli* DNAポリメラーゼのKlenowフラグメントとの混合物で満たした。これらの満たした末端にT4-DNAリガーゼ反応において

HindIII リンカーを加えた。連結反応混合物をフェノールとクロロホルムで抽出して、DNAを4 M酢酸アンモニウム/エタノールで沈澱させた。精製したDNAを過剰量のHindIII 酵素で消化して、380bpフラグメントを6%ポリアクリルアミドゲル上で精製した。RMP開放読取り枠の3'末端とTAA停止コドンを含むこのフラグメントを、HindIIIで消化してアルカリ性ホスファターゼで処理したpIC19Rに連結した。この連結混合物を用いて競合する*E. coli* 細胞を形質転換し、形質転換体をアンピシリン含有観点プレート上で選択した。プラスミドDNAを形質転換体から精製し、正確な組換体を制限エンドヌクレアーゼ消化とアガロースゲル電気泳動法によって同定した。かかる正確な組換体、pRMP3'から、210bp BglII/HindIII フラグメントを6%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって単離した。このフラグメントはアミノ酸 297~299で BglII部位からのRMP cDNA の3'末端を含み、TAA停止コドン中を通過して、挿入されたHindIII リンカー

まで伸びている。

RMP cDNA の5'部分は、1%アガロースゲル電気泳動法によって997bp HindIII/BglIIとしてpRMPから単離した。HindIII 部位は、プロセグメントにおいて残基-38、-35に対応する位置においてRMP-DNA中に配置されている。997bp 5'フラグメントをHindIIIで消化してホスファターゼ処理したpIC19R中で210bp 3'フラグメントに連結した。この連結混合物を用いて、組換体を*E. coli* から得て、3'部分に結合したRMPの5'部分を有する正確なプラスミドpRMPは制限酵素分析によって同定した。pRMPの構成を第5図に示す。pRMPはRMPプロ領域およびプロセグメントの5'半分を暗号化しない。

#### 実施例4

##### 活性RMPを分泌するように設計した*Aspergillus*発現ベクターの構成

この実施例では、プラスミドをグルコアミラーゼプロモーター、シグナルおよびターミネーター

配列の制御下にRMPを発現するように設計して構成した。グルコアミラーゼプロモーターおよびターミネーター配列をベクターpCANG91でクローン化したグルコアミラーゼゲノム遺伝子から誘導した。pCANG91の構成はBoelら(EMBO Journal, 第3巻, 1984年, 1581~1585頁)によって報告されており、プラスミドpCANG91のエンドヌクレアーゼ制限マップは第6図に示す。

pCANG91をSalIおよびPstI制限エンドヌクレアーゼで消化した。上記消化物から、アガロースゲル上で698bpフラグメントを単離した。このSalI-PstIフラグメントはグルコアミラーゼmRNAの140bp 3'未翻訳部分を暗号化する領域を含む。この3'フラグメントはT4-DNAポリメラーゼで処理して、XbaIリンカーの添加およびXbaI制限酵素での消化の前に制限部位を「プラント・エンド」させた。このグルコアミラーゼ遺伝子の3'末端をXbaIで線形化したpUC13に連結してグルコアミラーゼ遺伝子ポリ(A)付加領域を含むプラスミドpAMG/Termを生成させた。

pAMG/Termの構成は、第7a図に示す。

*A. niger*グルコアミラーゼ遺伝子の3'末端は、pAMG/Termからの700bp XbaIフラグメントとして得た。このターミネーターフラグメントを、XbaIで消化してホスファターゼ処理したpIR19Rに連結した。この連結混合物を用いて、*E. coli* から組換体を得られ、正確なプラスミドpICANG/TermであってpIC19Rの多重クローニング部位のHindIII 部位に面するターミネーターフラグメントの5'末端を有するものは制限酵素分析によって同定した。pICANG/Termの構成を、第7a図に示す。pICANG/Termから、グルコアミラーゼターミネーター(AMGターミネーター)領域を1%アガロースゲル電気泳動法によって750bp HindIII/ClaI 制限フラグメントとして単離した。pCANG91から、グルコアミラーゼプロモーター(AMGプロモーター)を、グルコアミラーゼシグナルペプチドを暗号化する領域、ヘキサペプチドプロセグメントおよび3.5kb ClaI/BssHIIフラグメントとしてのpBR322アンピシリン耐性遺伝

子(Amp)と共に、1%アガロースゲル電気泳動法によって単離した。合成BamHI/HindIII リンカーは、Applied Biosystems Inc. 製DNA合成装置上で合成した2種類の合成31マー・オリゴヌクレオチドから調製した。合成リンカーは下記の構造を有する。

R V S K Q S E S K D  
CGCGTAAGTAAGCAGACCGACGCAAGCATA  
ATTCATTGCTCTCGCTCTCGTTCTATTCCA

このリンカーを、3.5 kbグルコアミラーゼプロモーターを含むフラグメントおよび750bpグルコアミラーゼターミネーターを含むフラグメントとの連結反応に用いた。連結混合物を用いて*E. coli*を形質転換して、正確な組換え体、p873は制限エンドヌクレアーゼ消化によって同定した。単離したp873はHindIII クローニングベクターであり、この中に適当なHindIII cDNAフラグメントをグルコアミラーゼヘキサペプチドプロセグメントおよびグルコアミラーゼ転写ターミネーター領域の間に挿入することができる。挿入したcDNAは

ゼ遺伝子または*A. oryzae*からのTAKA-アミラーゼ遺伝子からのプロモーターの制御下において発現プラスミドに挿入すべきである。これを行うために、BamHI制限エンドヌクレアーゼ部位を、次の工程によってアレプロRMPのシグナルペプチドの開始メチオニンコドンの5'に挿入した。pRMP1016を、cDNAにおいてアミノ酸残基Ser(-66)およびGln(-85)に対応する位置で切断するDdeIと、cDNAにおいてアミノ酸残基Lys(-38)およびLeu(-35)に対応する位置で切断するHindIIIで消化した。精製する89bp DdeI/HindIIIフラグメントを8%ポリアクリルアミドゲル上で精製し、フェノールおよびクロロホルム抽出の後電気溶出し、エタノール沈澱した。以下の配列を有する合成DNAフラグメントは、アプライドバイオシステム社製DNA合成装置上で2個のオリゴヌクレオチドとして合成した。

M L F S  
GATCCACCATGCTGTTCTC オリゴ697/698  
GTGCTACGACAAGCAAGT

グルコアミラーゼプロモーターによって転写制御され、翻訳された融合生成物の分泌はグルコアミラーゼシグナルペプチドとグルコアミラーゼヘキサペプチドプロセグメントとによって指示される。p873をHindIIIで消化して、アルカリ性ホスファターゼで処理して、pRMPの消化物から精製した1.2 kbHindIIIと連結した。

連結混合物を用いて*E. coli*を形質転換し、RMPを発現させるために正確な位置に挿入されたRMP cDNAを有する組換え体p686は制限エンドヌクレアーゼ消化によって単離されて特微化された。p686は以下の構造：グルコアミラーゼシグナルペプチド、グルコアミラーゼヘキサペプチド、RMPからのプロペプチドのアミノ酸-45から-1、成熟RMPの361個のアミノ酸を有するRMP前駆体を暗号化する。p686の構成を、第7b図に示す。

#### 実施例5

本発明の好ましい態様では、アレプロRMPの開放読取り枠を、*A. niger*からのグルコアミラー

このフラグメントは、開始Met-コドンに対してBamHI付替末端5'および3'末端にDdeI付替末端を有する。これら2個のオリゴヌクレオチドは、ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼでキナーゼ化し、互いにアニーリングして、次いでBamHI/HindIIIで消化したpUC13ベクター中でpRMP1016から精製した89bp DdeI/HindIII RMPフラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli*細胞を形質転換し、正確な組換え体をミニアレプロ精製プラスミド上で制限酵素消化によって同定した。正確な組換えプラスミドを配列して、使用したオリゴヌクレオチドの配列を証明した。かかる正確なプラスミドpRMP5'をBamHIおよびHindIIIで消化して、開始Metコドン、RMPシグナルペプチドおよびRMPプロセグメントの部分を含む110bp BamHI/HindIIIフラグメント10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によって精製した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルム抽出し、エタノールで沈澱した。RMP開放読み込み枠の残

りおよびAMGターミネーター配列をEcoRIで消化し、HindIIIで部分消化した後プラスミドp688から得た。これによって、1.9 kbフラグメントを放出し、このフラグメントをアガロースゲル電気泳動法、電気溶出フェノールおよびクロロホルム抽出の後、エタノールで沈澱させた。この1.9 kbフラグメントを、BamHIおよびEcoRIで消化したpUC13ベクター中でpRM5'からの110bp BamHI/HindIIIに連結した。

この連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、正確な組換え体をミニプレア精製プラスミド上で制限酵素消化によって同定した。かかる正確な組換え体は、pRHPANGTermであった。

pRHPANGTermの構成を第8図に示す。

#### 実施例6

Aspergillus niger グルコアミラーゼプロモーターによってA. oryzae 中で活性RMPを分泌するように設計されたAspergillus 発現ベクターの構成

グルコアミラーゼプロモーターを以下のように

上でDNAフラグメントを分離した後、175bp BglIIフラグメントを電気溶出によって単離することができた。このフラグメントは、開始メチオニンコドンに対して5'のSmaI制限部位に対応する位置に挿入されたBglIIリンカーを有する。このDNA切片をBglIIで消化したアルカリホスファターゼ処理したpIC19Rベクターに連結して、この連結混合物を用いて*E. coli* 細胞を形質転換した。生成する形質転換体の中で、正確なプラスミドをミニプレアプラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。かかる正確なプラスミドpB404.1をNsiIおよびBglIIで消化して、グルコアミラーゼ遺伝子の5'未翻訳領域をプロモーター領域の3'部分の約100bpと共に含む0.16kbフラグメントを放出した。このフラグメントを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって精製した。このフラグメントをpCANG91からのグルコアミラーゼプロモーター領域の残りの部分に結合させるため、以下の工程を

して単離した。25μgのpCANG91をEcoRIおよびBssHII制限エンドヌクレアーゼで消化した。この二重消化の後、270bp DNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって単離することができた。このフラグメントは、プロモーター領域の一部、5'未翻訳領域およびグルコアミラーゼ遺伝子(AMG遺伝子)のシグナルペプチドをカバーする。アガロースゲルからDNAを電気溶出した後、フラグメントをフェノールおよびクロロホルム抽出し、次いでエタノール沈澱することによって精製した。次いで、270bpの長いフラグメントをSmaIで消化した。この酵素は、グルコアミラーゼ遺伝子の開始ATGメチオニンコドンに対して5'に開裂部位を有する。完全に消化した後、DNAをDNAポリメラーゼIの大きなフラグメント(Klenow)および4個のdNTP総てで処理して、DNA上にフラントエンドを生成させた。このDNAに、DNAリガーゼを有するBglIIリンカーを加えて、DNAをBglII制限酵素の過剰量で消化した。10%ポリアクリルアミドゲル

行った。25μgのpCANG91をBssHIIで消化した後、更にNdeIで部分的に消化した。フラグメント末端を4個総てのdNTPおよびDNAポリメラーゼのKlenowフラグメントで満たした後、1.4 kb DNAフラグメントを1%アガロースゲル上で単離した。このフラグメントは、総てのプロモーター領域を5'未翻訳領域およびシグナルペプチド暗号化領域と共に含んでいた。このフラグメントを電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって、DNAを濃縮した。NsiIで消化した後、DNAを1%アガロースゲル上で流して、1.2 kb NdeI-NsiIフラグメントを電気溶出によって単離した。このDNAは上記反応でNdeI部位にフラントエンドを生じ、これをHruI-BglIIで消化したpIC19Rベクター中でのpB404.1からの0.16kb NsiI-BglIIフラグメントに連結させた。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、精製する形質転換体の中から、正確な組換え体をミニプレアプラスミドの制限酵素消化によって同定した。上記の正確な組

換体、pD408.3をHindIII およびBglIIで消化して、グルコアミラーゼ(AMG)プロモーターを1%アガロースゲル上で1.4 kbフラグメントとして単離した。このフラグメントを電気溶出、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱した。このグルコアミラーゼプロモーターフラグメントを次に、HindIII-EcoRIで消化したpUC19ベクター中のpRMPANGTermからの2.0 BamHI-EcoRIフラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、精製する形質転換体の中から、正確な組換体をミニプレアプラスミドの制限酵素消化によって同定した。上記の正確な組換体の一つp778を大規模に成長させて、組換えプラスミドを単離して、プラスミド調製物をCaCl<sub>2</sub>/臭化エチジウム塩心分離によって精製した。このプラスミドをグルコアミラーゼプロモーターおよびターミネーター配列の制御下においてR.M.P.の合成を指示する。p408.3の構成を第9 a 図に示し、p778の構成を第9 b 図に示す。以下余白

ぞれのDNA末端において約130bpの欠失を得た。この方法ではTAKA-アミラーゼ遺伝子の暗号化領域のSalI部位からの約130bpの欠失は、開始メチオニンコドンの上流に多重クローニング部位リソナーを導入する機会を生じる。エクソヌクレアーゼIIIで処理したDNAを、Henikoff, S. (Gene, 第28巻, 351~359頁, 1984年)の方法に従ってS1ヌクレアーゼIIIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出した後エタノールで沈澱した。S1ヌクレアーゼで処理したDNAを補修して連結可能なブラントエンドを得ることは、Henikoff, S. (Gene, 第28巻, 351~359頁, 1984年)の方法に従って、4個のdNTP総てとDNAポリメラーゼIのKlenowフラグメントを用いて行った。DNAをEcoRIで消化して、1300bp SalIフラグメントで切断して、2群のフラグメントを生成した。一つの群は約380bpの長さであり、蒸留領域を表わしたが、他の群は620bpの長さであり、プロモーター領域を含んでいた。EcoRI消化生成物のこれらの群をアガロースゲル

#### 実施例7

*Aspergillus oryzae* TAKA-アミラーゼプロモーターによる活性RMPを分泌させるように設計された*Aspergillus* 発現ベクターの構成

*Aspergillus oryzae* TAKA-アミラーゼゲノム遺伝子を含むプラスミドpTAKA 17(実施例2を参照されたい)50μgをSalIで消化した。この酵素は、成熟TAKA-アミラーゼのアミノ酸残基26に対応する位置においてゲノムDNAでの制限部位を有する。もう一つのSalI制限部位はこの位置に対して約1300個のヌクレオチドだけ上流の、上流プロモーター領域の5'末端に配設される。SalI消化の後、この1300bpプロモーターを含むフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製し、DNAをフェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノール沈澱によって精製した。次いで、DNAをエクソヌクレアーゼIII緩衝液中に溶解して、Henikoff, S. (Gene, 第28巻, 351~359頁, 1984年)の方法に従ってエクソヌクレアーゼIIIで消化した。反応を停止して、それ

上で分離して、約620bpの長さのDNAフラグメントを電気溶出して、EcoRI/SmaIで消化したpUC19ベクターに連結した。連結混合物を用いて、融合する*E. coli* 細胞を形質転換し、組換体から、ミニプレアプラスミドDNAを単離した。これらの欠失変異株を制限酵素消化によって特徴化して、開始メチオニンコドンに対して5'の欠失末端を有するプラスミドを同定した。所望な特徴を有する数個の候補を配列させ、ATG-メチオニンコドンにおけるAに対して9bpを欠失した5'を有する変異株(p9)を選択して、更に構成した。p9をEcoRIおよびHindIIIで消化して、フラグメントを含む845bp TAKA-アミラーゼプロモーターをアガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって単離した。pTAKA 17をSalIおよびEcoRIで消化して、TAKA-アミラーゼプロモーター上流領域を含む510bpフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって単離した。これ

らの2個のプロモーター領域を互いに連結させ、且つ Sal I および Hind III で消化した pUC19 ベクターに連結させた。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、正確な組換体を、ミニプレブとして抽出されたプラスミドを制限酵素で消化することによって同定した。かかる組換体の一つ p719 では、*Aspergillus oryzae* からの TAKA-アミラーゼプロモーターフラグメントは、多数の各種制限酵素消化液によって削除することができる 1.1 kb の移動可能なフラグメントとして見出されている。p719 の構成を第 10 図に示す。

pRMPANGTerm から、プレプロ RMP 開放読取り枠およびグルコアミラーゼターミネーター領域 (ANGTerm) を、BamHI および EcoRI で消化した後 2 kb フラグメントとして単離した。このフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、次いでフェノールおよびクロロホルム抽出およびエタノールでの沈澱によって精製した。*A. oryzae* からの TAKA-アミラーゼからのプロモーターを、p719 を Sal I および BamHI で消化した後に得られる 1.1

kb フラグメントとして単離した。このフラグメントを、アガロースゲル電気泳動法、フェノールおよびクロロホルム抽出、次いでエタノールでの沈澱によって精製した。1.1 kb プロモーターフラグメントを Sal I および EcoRI で消化した pUC19 ベクターにおいて pRMPANGTerm からの 2 kb BamHI / EcoRI フラグメントに連結した。連結混合物を用いて、*E. coli* 細胞を形質転換し、精製する組換体から、正確な組換体を、ミニプレブプラスミドを制限酵素で消化することによって同定した。かかる正確な組換体の一つ p777 を大規模に成長させて、組換えプラスミドを単離し、プラスミド調製物を CsCl / 臭化エチジウム遠心分離によって精製した。p777 の構成を第 11 図に示す。

#### 実施例 8

*Aspergillus oryzae* TAKA-アミラーゼプロモーターの制御下による *Rhizomucor miehei* リパーゼを分泌させるように設計された *Aspergillus* 発現ベクターの構成  
以下余白

#### *E. coli* におけるリパーゼ cDNA クローンの構成および同定

特異的オリゴヌクレオチドアローブを構成させることができる情報を得るため、精製した *Rhizomucor miehei* リパーゼ (Moskowitz, G.J. ら、J. Agric. Food Chem., 第 25 巻、1977 年、1148~1150 頁) について部分配列を決定した。以下の説明では、RML という略号を *Rhizomucor miehei* リパーゼについて用いた。菌糸体および低分子量物質を除去した *Rhizomucor miehei* の培養液からの上澄液を、陰イオン交換クロマトグラフィーに付した。カラムからの主要な脂肪分解性分画を、凍結乾燥する前に脱塩および限外ろ過した。次いで、凍結乾燥した粉末を、親和性クロマトグラフィーに付した。カラムからの貯蔵したリパーゼ分画を脱塩して、限外ろ過によって濃縮した。次いで、この濃縮液を疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) に付して、HIC-精製からのリパーゼを用いてアミノ酸配列を決定した。配列の決定は、元の酵素 (N-末端配列) およびリパーゼを

*Armillaria mellea* プロテアーゼを用いてタンパク分解性消化を行った後に得られる選択されたフラグメントの両方について行った。配列の決定は、Thia, L. ら、(FEBS Lett. 1987 年、印刷中) によって報告されたのと同じ方法で Gas Phase Sequencer (Applied Biosystems Model 470A) で行った。

RML を、酵素の基質に対する比率を 1 : 40 (モル : モル) としたことを除いて Moody ら (FEBS Lett., 第 172 巻、1984 年、142~148 頁) によって報告されたのと同じ *Armillaria mellea* プロテアーゼを用いて消化した。得られたフラグメントを HPLC によって分離して、UV 吸収を 280nm および 214nm で観察した。オリゴヌクレオチドアローブの構成のための好適なフラグメントを同定するには、これらのフラグメントは Trp および / または Tyr を含むので、280nm および 214nm の間で高い比率を示したペプチドのみを配列した。

以下の N-末端配列が、元の RML を使用することによって見出された。



Ser-Ile-Asp-Gly-Gly-Ile-Arg-Ala-Ala-Thr-Ser-  
Gln-Glu-Ile-Asn-Glu-Leu-Thr-Tyr-Tyr-Thr-X-  
Leu-(Ser)-(Ala)-

タンパク分解性消化液から単離されたフラグメントの一つは、配列Arg-Thr-Val-Ile-Pro-Gly-Ala-Thr-Try-Asp-X-Ile-Ileを有し、このフラグメントを特異的オリゴヌクレオチドアプローブの合成に用いた。

Rhizomucor miehei からのアスパラギン酸プロ  
 テイナーゼ(RMP)組換体を単離するために構成  
 された実施例3からの上記生物のcDNAライブ  
 ラリーも用いてリパーゼに特異的な組換体を同定  
 した。オリゴヌクレオチドの混合物を、Applied  
 Biosystems Inc. 製DNA合成装置で合成した。  
 構造

5' <sup>A</sup>TCCCAAGTNGCNCC 3' 430/431  
F

を有する混合物は、アミノ酸Gly-Ala-Thr-Trp-

開始メチオニンコドンを含むシグナルペプチドの5'部分についての配列を含まないので、合成オリゴヌクレオチド(584)

5' CCACAGGGGATCAGGGGTGG 3' . 584

を合成した。このオリゴヌクレオチド 584 は、ポリペプチド領域で見られるアミノ酸配列

Pro-Pro-Leu-Ile-Pro-Ser-Arg

を略号化する領域における RML mRNA に相補的である。オリゴ 584 を T4 ポリヌクレオチドキナーゼ および 32 P- $\gamma$ -ATP を用いて高い比活性にまでキナーゼ処理した後、記載された方法 (Doel, E. ら, PNAS, USA, 第 80 巻, 2866~2869 頁, 1983 年) によって、Rhizomucor miehei mRNA での AMV リバース・トランスクリプターゼとのプライマー伸長反応に用いた。プライマー伸長反応生成物を 10% ポリアクリルアミド/尿素ゲル上で電気泳動して、2 個の cDNA 生成物を分割した。これらの 2 個の cDNA、すなわち一つは 150 個のヌクレオチドの長さであり、もう一方は 180 個のヌクレオチド長さのものを、両

A<sub>20</sub>を暗号化する領域においてRML mRNAに相補的であった。このペントペプチドは、精製したRMLタンパクのタンパク分解性フラグメントから得られるアミノ酸配列のセグメントとして同定された(上記参照)。

Rhizomucor miehei cDNAライブラリーを、RMP特異的混合物でスクリーニングするのに記載した方法と同様にして32P-キナーゼしたリパーゼオリゴヌクレオチド混合物でスクリーニングした。交雑およびフィルターの最初の洗浄は、43℃で行った。オートラジオグラフィーの後、フィルターを47℃で洗浄した。強力な交雑を示したコロニーを単離して、対応するプラスミドにおいて挿入されたcDNAを配列してRML特異的組換え体を同定した。かかる2個の組換え体p353.7およびp353.16は、約1.2 kbのインサートを有した。これらの2種類の組換え体から得られるDNA配列は、シグナルペプチドの中央で開始し、ポリAテイルにまで伸びている。この領域では、長い開放読取り枠を同定できた。2個の組換え体は、

方とも電気溶出し、DNA配列のための化学的分  
 解法によって配列した。両者のcDNAはプライ  
 マー領域から伸びており、開始メチオニンコドン  
 に対して位置9のヌクレオチド5'までの読取り  
 可能な配列を生じた。この配列は、リバーゼ組換  
 えcDNAプラスミドから得られた配列であるこ  
 とを示した。2個のプライマー伸長cDNA生成  
 物の長さは、リバーゼmRNAの5'末端(CA  
 P-部位)が第12図に示した第一のAヌクレオ  
 チドに対して約5または15ヌクレオチド5'に  
 配列される。菌類からのmRNAの5'末端の位  
 置におけるマイクロヘテロゲナイエティは、極め  
 て一般的である。2個のクローン化したp353.7お  
 よびp353.16から得られる配列をプライマー伸長  
 分析からの配列と結合することにより、RML前  
 駆体のアミノ酸配列を確立することができる。  
 DNA配列およびRML前駆体の対応するアミノ  
 酸配列を第12図に示す。第12図では、水平線  
 はcDNA合成およびcDNAライブラリースク  
 リーニングに用いられた合成オリゴの位置を示し

ている。矢印は、元のRMLの成熟において加工が起こる位置を示す。ヌクレオチドは、開始Metコドンでの最初の塩基から番号を付け、アミノ酸は成熟した元のRMLにおける最初の残基から番号を付ける。RMLを開始Metコドンから伸びている開放読み込み枠によって暗号化し、次いで停止コドンに達する前に383コドンを通る。この前駆体では、最初のアミノ酸残基は、典型的な疎水性シグナルペプチドから成る。von Heijne (Eur. J. Biochem., 第113巻、17~21頁、1983年)の生産則によれば、シグナルペプチドは、それぞれ、位置-71および-70でのAla-およびVal残基の間のシグナルペプチダーゼ開裂によって以下のプロペプチドから開裂する。

*Rhizocor. niehei*からの培養液の上澄みから得られる精製RMLのN末端アミノ酸配列分析は活性RML酵素のN末端としてSer-Ile-Asp-Gly-Gly-Ile-Araを同定したので、RML前駆体のプロペプチドは前駆体における次の70個のアミノ酸残基から成っていた。このN末端Ser残基から

始めて、成熟RMLは停止コドンに達するまでに289個の残基を通して伸びる。この成熟29500ダルトン酵素では、リパーゼ基質結合部位は、多数のリパーゼに保存されている残基Ser(144)の付近に配置される。RML mRNAの3'末端では、104個のヌクレオチドがTAA停止コドンとポリ(A)テイルとの間の未翻訳領域として配置された。このポリ(A)テイルに対して23ヌクレオチド5'では、7AT塩基対から成る反復構造が見出されたが、典型的な真核生物のポリアデニル化シグナルは同定されなかった。

本発明の好ましい具体例では、RML cDNAについて多くの変更を行った。これらの変更は、開放読み込み枠に対して制限エンドヌクレアーゼ部位5'および3'をクローニングおよび付加の際に、cDNAに加えたG:Cテイルの除去を含む。多くの好都合な制限部位も、cDNAのシグナルペプチドおよびプロペプチド領域に導入された。

p353.16をFnuDIIで消化して、アガロースゲル

電気泳動によって880bp DNAフラグメント(RML cDNAの3'末端)を単離した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱した。

RML cDNAの3'末端を次いでSmaIで消化し且つアルカリ性ホスファターゼで処理したpUC19ベクターに連結した。連結反応を用いて、競合する*E. coli*細胞を形質転換し、精製した形質転換体から正確な組換体をミニプレアプラスミドの制限酵素消化によって同定した。一つのかかる好適な組換体p435.2をBamIおよびHindIIIで消化し、0.69kbフラグメントをアガロースゲル電気泳動法で単離した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出し、エタノールで沈澱した。RML cDNAのフラグメントは、3'未翻訳領域に結合したpUC19多重クローニング部位の主要部分を有していた。

RML cDNAの5'末端を、合成オリゴヌクレオチドを用いて再設計して、好都合な制限部位を導入した。合成フラグメント(RML 5')の

DNA配列を第14図に示す。導入した制限部位の位置および個々に合成したオリゴヌクレオチドの結合部位を水平線乃至垂直/水平線によって示す。精製するフラグメント(RML 5')を2%アガロースゲル上で150bpフラグメントとして精製し、電気溶出し、フェノールおよびCHCl<sub>3</sub>で抽出し、更に連結反応を行う前にエタノールで沈澱した。

p353.7をBamIおよびBamIIで消化して、387bp RMLフラグメントを10%ポリアミルアミドゲル電気泳動法によって精製した。このフラグメントを電気溶出し、フェノールおよびクロロホルムで抽出した後、エタノール沈澱をして、次いで合成RML 5'フラグメントおよびBamII/HindIIIで消化したpUC13ベクターにおいてp435.2からの0.69kb BamII/HindIIIフラグメントに連結した。連結反応を用いて、競合する*E. coli*を形質転換して、精製する形質転換体から正確な組換体をミニプレアプラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。一つのかかる正確な組

換体pB544では、合成部分を配列して予想した構造を確認した。pB544の構成を第13a図に示す。pB544からアプレプロRML cDNAをアガロースゲル電気泳動法によって、1.2 kb *Bam*HIフラグメントとして単離した。*Aspergillus oryzae* TAKA-アミラーゼ遺伝子からのプロモーターおよび*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ遺伝子からのターミネーターに基づく発現ベクターを、以下のようにして調製した。p719(実施例7参照)を*Sal*Iおよび*Bam*HIで消化した。生成する1.1 kb TAKA-アミラーゼプロモーターフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製した。pICAMG/Term(実施例4参照)は、*Bam*HIおよび*Eco*RIで消化した。生成する0.75 kb TAKA-アミラーゼターミネーターフラグメントをアガロースゲル電気泳動法によって精製した。フェノールおよびクロロホルム抽出の後、これらの2種類のフラグメントをエタノールで沈澱し、*Sal*I/*Eco*RIで消化したpUC19ベクターに連結した。連結反応を用いて、*E. coli*を形質転換して、精製

する形質転換体から正確な組換え体をミニアプレプラスミド上で制限酵素消化することによって同定した。一つのかかる正確な組換え体p775を*Bam*HIで消化して、アルカリ性ホスファターゼで処理した。pB544からの1.2 kb *Bam*HI RMLアプレプロ cDNAフラグメントをこのp775ベクターに連結して、*E. coli*中に形質転換した。プロモーターとターミネーターとの間で正確な位置に挿入されたRMLアプレプロ cDNAを有する組換えp787を、*E. coli*形質転換体から抽出したミニアプレプラスミド上で制限酵素による消化によって同定した。p787プラスミドDNAを大規模に成長させて、プラスミド調製物をCaCl<sub>2</sub>/臭化エチジウム遠心分離によって精製した。p787の構成を第13b図に示す。

#### 実施例9

##### *Aspergillus oryzae*の形質転換(一般的処理法)

100mlのYPD (Shermanら、Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981年)に*A. oryzae*, IFO 4177またはそのargB変

異株の胞子を接種して、振盪しながら37℃で約2日間培養した。ミラクロスを通して濾過することによって菌糸を回収して、0.6 MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 200 mlで洗浄した。菌糸を15 mlの1.2 MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、10 mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH=5.8に懸濁させた。懸濁液を氷で冷却し、Novozym<sup>R</sup> 234、パッチ1687を120 ml含む緩衝液1 mlを加えた。5分後、1 mlの12 mg/ml BSA (Sigma, H25型)を加えて、緩やかに攪拌しながら1.5~2.5時間37℃でインキュベーションし、顕微鏡下で検討した試料中において多数の原形質体が観察されるようになるまで継続した。

懸濁液をミラクロスを通して濾過し、濾液を無菌チューブに移して、5 mlの0.6 Mソルビトール、100 mM トリス-HCl、pH=7.0を積層した。

1000gで15分間遠心分離を行い、原形質体をH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> クッションの上部から収集した。2容量のSTC (1.2 Mのソルビトール、10 mMのトリス-HCl、pH=7.5、10 mMのCaCl<sub>2</sub>)を原形質体懸濁液に加えて、混合物を1000gで5分間遠心

分離した。原形質体ペレットを3 mlのSTCに再懸濁して、再度成型した。これを繰り返した。最後に、原形質体を0.2~1 mlのSTCに再懸濁した。

100 μlの原形質体分散液を5~25 μgの適当なDNAを10 μlのSTCに懸濁したものと混合した。argB株からの原形質体をpSal43 DNA (*A. nidulans* argB遺伝子を担持するプラスミド) およびargB<sup>+</sup>株からの原形質体をp3SR2 (*A. nidulans* argB遺伝子を担持するプラスミド)と混合した。混合物を室温で25分間放置した。0.2 mlの60%PEG4000(BDH29578)、10 mMのCaCl<sub>2</sub> および10 mMのトリス-HCl、pH=7.5を加えて、注意深く混合し(2回)。最後に0.85 mlの上記溶液を加えて、注意深く混合した。混合物を室温で25分間放置し、2500gで15分間遠心分離し、ペレットを再度2 mlの1.2 Mソルビトールに懸濁した。もう一回沈澱させてから、原形質体を適当なプレートに塗布した。pSal43で形質転換したargB株からの原形質体を炭素および窒素源

として、それぞれグルコースおよび尿素を有し、且つ浸透圧安定のために1.2 Mソルビトールを含む最少限のプレート(Cove, Biochem. Biophys. Acta, 第113巻、1968年、51~58頁)に塗布した。  
p3SR2で形質転換したargB<sup>+</sup>株からの原形質体を、1.0 Mスクロース、pH=7.0、窒素源として1.0 mMのアセタミド、およびバックグラウンド成長を抑制する2.0 mMのCsClを含む最少限のプレート(Cove, Biochem. Biophys. Acta, 第113巻、1968年、51~58頁)に塗布した。37℃で4~7日間インキュベーションした後、胞子を回収して、滅菌水に懸濁し、塗布して単一コロニーとした。この処理法を繰り返して、2回の再分離の後、単一コロニーの胞子を定義した形質転換体として保存した。

#### 実施例10

##### 野生型 *A. oryzae*におけるTAKA-アミラーゼの発現

pTAKA 17を、実施例9に記載したようにに *A. nidulans* からのamdS遺伝子を含むp3SR2で共形質

転換することによって、*A. oryzae* IFO 4177中に形質転換した。上記のように調製した原形質体を等量のpTAKA 17およびp3SR2であってそれぞれ約5μgを用いた混合物とインキュベーションした。単一窒素源としてアセタミドを用いることができる9個の形質転換体を、2回再度単離した。YPD(Shermanら、1981年)上で3日間成長させた後、培養液上澄みをSDS-PAGEによって分析した。ゲルを、コマージー・ブリアント・ブルーRで染色した。最良の形質転換体は、形質転換していないIFO 4177の10~20倍のアミラーゼを生成した。一つの形質転換体を更に研究するために選択して、2リットルKjeller醗酵装置中で4%大豆ミール上で成長させ、成長中にグルコースを供給した。醗酵中に、培養液を激しく攪拌した。これらの条件下では、IFO 4177は約1g/lを生じ、形質転換体は酵素活性として測定したところ約12g/lのアミラーゼであった。酵素活性を澱粉を分解する能力として測定した(Cereal Chemistry, 第16巻、1939年、712~723頁)。使用した澱粉

はMerck Amylum solubileerg B.6であり、分析はpH4.7および37℃で行った。外部からβ-アミラーゼを加えなかった。

#### 実施例11

##### *A. oryzae* におけるRMPの発現

実施例7からのp777または実施例6からのp778を、実施例9に記載の処理法によってp3SR2と共に共形質転換することによってIFO-4177中へ形質転換した。形質転換体を選択して、実施例9に記載のように再度単離した。

形質転換体をYPD中で3日間成長させ、上澄みをSDS-PAGEの後にWestern blottingおよびELISAを行って分析した。p777およびp778からの形質転換体の上澄液は、RMP抗体と反応するタンパク50~150mg/lを含んでいた。プロテイナーゼは、*R. miehei* で生成したプロテイナーゼと比較して過剰にグリコシル化した。2つの形状のうち、一方はプロ型であり、他方は加工された成熟プロテイナーゼであると思われた。p778の2種類の形質転換体およびp777の3種類の

形質転換体を、上記TAKA-アミラーゼ形質転換体と同様に醗酵装置中で成長させた。p778の2種類の形質転換体は、Kunitz法(Kunitz, H., Jour. Gen. Physiol., 第18巻、1935年、459~468頁)によるミルク凝固活性として測定したところ、約0.2g/lおよび0.4g/lのRMPを生じ、p777の3種類の形質転換体は約0.5g/l、2.4g/lおよび3.3g/lのRMPを生じ、組換えRMPの特異的活性は*Rhizomucor miehei* の活性と同じであると考えられた(これについては、後で確認した)。SDS-PAGEおよびSDA-PAGEの後にWestern-blottingおよびELISAを行ったところ、大規模で培養する場合には、1つの形状のRMPのみが存在することが判った。RMPはこれらの成長条件下でも、過剰にグリコシル化した。ゲル上にみられるタンパクの量は、酵素活性から予測された量とよく相関を有した。

RMPを親和性クロマトグラフィーおよび寸法排除クロマトグラフィーによって培養液の上澄みから精製した。

精製した組換えRMPのN-末端配列を、Thia  
ら(TEBS Lett. 1987年、印刷中)によって報告さ  
れたのと同様に気相配列装置を用いて、測定した。

組換えRMPの2つの形状はN-末端における  
加工が不均一であることを示した。一つの形状は  
Ala-Asp-Gly-Ser-Val-Asp-Thr-Pro-Gly-TyrのN  
-末端配列を有し、もう一方はGly-Ser-Val-Asp-  
Thr-Pro-Gly-Tyr-Tyr-AspのN-末端配列を有し  
た。N-末端でのかかる不均一加工も、Hueor  
miehieからの元のRMPについて記載されている  
(Paquet, D.ら, Natl. Milk Dairy J., 第35巻,  
1981年、358~380頁)。組換えRMPの不均一加  
工は元のRMPの不均一加工と良好な相関を有し、  
A. oryzae は本発明によれば正確な領域で組換え  
RMPを加工することができることが判った。

#### 実施例12

##### A. oryzae におけるプロキモシンの産生に就い ての発現単位の構成

この構成は、A. oryzae アミラーゼプロモタ  
ーの制御下でA. oryzae TAKA-アミラーゼ遺伝子

からのシグナルペプチド配列がすぐ先行するプロ  
キモシン遺伝子を含む。この構成は更に、A.  
nigerグルコアミラーゼ遺伝子とE. coli複製体か  
らのからのターミネーターを含む。

p285' proC(実施例1参照)からの約430 bp  
BamHI/XmaIフラグメントおよび以下の配列

```

AATTCCAGCTGCCCGCGCCGACATCACCAG
GGTCGACGGCGCGGCTCTAGTGGTCTAG

```

を有する合成オリゴマーをEcoRI-XmaI切断  
pUC19プラスミド中に挿入して、プラスミド  
pToC50aを生成した。

pToC50aをEcoRI-SacIIで切断し、pUC19を含  
む大きなフラグメントとプロキモシン遺伝子(ア  
ロキモシン')の5'部分を単離した。このフ  
ラグメントをpTAKA17からの0.6 kb EcoRI-  
BamIフラグメントおよび以下の合成オリゴマー  
と連結した。

```

GCACCTGCTTTTGGC
GACGAAAC (KFN 280/281)

```

形質転換の後、A. oryzae TAKA-アミラーゼ遺

伝子(アレTAKA)からのシグナル配列に融合し且つ  
約500bp上流のTAKA-アミラーゼ配列が先行する  
プロキモシン遺伝子(プロキモシン')の5'部分  
を含むプラスミドpToC51を単離した。pToC51の構  
成を第15a図に示す。

pR26をHinfIで切断して、DNAポリメラーゼ  
Iおよび4個のdNTPの大きなフラグメント  
(Klenow)で処理し、XmaIで切断した。プロキモ  
シン遺伝子の3'末端を含む750bpフラグメント  
を単離した。このフラグメントの3'末端での  
HindIIIを挿入するために、pUC9をXmaI/HincII  
で切断して、大きなフラグメントをプロキモシ  
ン遺伝子の3'末端を含む750bpフラグメントに連  
結した。

pTAKA 17からの5.6 kb EcoRI-ClaIフラグメ  
ントを単離して、同じプラスミド貸せの2.6 kb  
ClaI-HindIIIフラグメントおよびA. nigerグル  
コアミラーゼ遺伝子ターミネーターおよびポリA  
部位を含むpICANG/Term(実施例4参照)からの  
0.7 kb EcoRI-HindIIIと連結した。生成するア

ラスミド輪pToC52として第15b図に示す。

pToC52をHindIIIで切断し、EcoRIで部分的に  
切断し、6.4 kbフラグメントを単離した。これを  
pToC51からの0.9 kb EcoRI-XmaIフラグメント  
およびプロキモシン遺伝子('プロキモシン')の3  
部分を含むpUC9'PCからの0.7 kb XmaI-HindIII  
フラグメントと連結した。生成するプラスミドは  
pToC56と呼ばれ、第15b図に示す。

#### 実施例13

##### A. oryzae におけるプロキモシンの発現

p3SR2(amdS遺伝子)またはpSal43(argB遺伝子)  
と共形質転換することによって、pToC56をA.  
oryzae IF0 4177 またはargB変異株に形質転換し  
た。選択的増地で成長する形質転換体を、実施例  
9と同様に2回再度単離した。

形質転換体をYPD中で3日間成長させ、上澄液  
のプロキモシン含量をSDS-PAGE後Western  
ブロット上でELISAによって分析した。形質  
転換体は、上澄液中に1~10ng/lのプロキモ  
シンの寸法免疫反応性タンパクを産生した。他の

免疫反応性タンパクは上澄液中に検出されなかった。

#### 実施例 14

##### A. oryzae における RML の発現

実施例 8 からの p787 を、実施例 9 に記載の方法によって p3SR2 で共形質転換することによって IF0-4177 中に形質転換した。形質転換体を実施例 9 と同様に選別して、再度単離した。

3 日間成長させた形質転換体の YPD 培養液からの上澄液を、SDS-PAGE の後に Western ブロットおよび ELISA を行って分析した。最良の形質転換体は、タンパク 1 リットル当り 2 mg の成熟 RML の寸法を産生した。上澄液におけるリパーゼ活性を、トリブチリンを開裂する能力として計測した (NOVO 法 AF 95.1/3-GB)。

この測定によって上澄液に 2 mg/l の活性リパーゼが存在することが判った。

#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、TAKA-アミラーゼプロモーターおよび上流プロモーター領域の DNA-配列を示し、

第 2 図は、プラスミド pTAKA 17 のエンドヌクレアーゼ制限マップを示し、

第 3 図は、プラスミド p285 'proC の構成を示し、

第 4 a および b 図は、3 文字省略によって与えられる推定アミノ酸配列を有するブレアロ Rhizomucor miehei アスパラギン酸プロテイナーゼの DNA 配列を示し、

第 5 図は、プラスミド pRMP の構成を示す。

第 6 図は、プラスミド pCANG91 のエンドヌクレアーゼ制限マップを示し、

第 7 a 図はプラスミド pCANG/Tera の構成を示し、

第 7 b 図は、プラスミド p888 の構成を示し、

第 8 図は、プラスミド pRMPANG/Tera の構成を示し、

第 9 a 図は、プラスミド p8408.3 の構成を示し、

第 9 b 図は、プラスミド p8778 の構成を示し、

第 10 図は、プラスミド p8719 の構成を示し、

第 11 図は、プラスミド p777 の構成を示し、

第 12 図は、3 文字省略によって与えられる推

定アミノ酸配列を有するブレアロ Rhizomucor miehei リパーゼ c DNA の配列を示し、

第 13 a 図は、プラスミド p8544 の構成を示し、

第 13 b 図は、プラスミド p787 の構成を示し、

第 14 図は、合成フラグメント RNL5' の DNA 配列を示し、

第 15 a 図は、プラスミド pToC51 の構成を示し、

第 15 b 図は、プラスミド pToC58 の構成を示す。

#### 特許出願人

ノボ インダストリ

アクティーゼルスカブ

#### 特許出願代理人

弁理士 青 木 朗

弁理士 西 館 和 之

弁理士 石 田 敬

弁理士 山 口 昭 之

弁理士 西 山 登 也

FIG. 1

-1167 -1167 -1157 -1147 -1137 -1127  
 -1176 AGATCTGCCC TTATTAATCT CTAAGTCTGA TCGTCGAGGC ATTCGGAATA  
 -1126 CGAGGCGCTGA TTAATGATTA CATACGCTC CGGCTAGTAG ACCGAGCAGC  
 -1076 CGAGCCAGTT CAGGCGCTAA AGCGCTTAT ACAATTAAGC AGTTAAAGAA  
 -1026 GTTAGAATCT ACGCTTAAA AGCTACTTAA AATCGATCT CGAGTCGCG  
 -976 ATTGCGCTAT CAAACCCGT TTAATCAAC TGATTAAGG TCGCGAAGCA  
 -926 GCTATAATG ATATACAT ATTAAGCAT TAATTAGAGC AATATCAGGC  
 -876 CGCGCAGCA AGCNACTTA AAAGCGAAA GCGCTCTACT AACAGATTA  
 -826 CTTTGAANA ACCACATCA GTATTTAAG CCGAATCTT TATTARGGC  
 -776 CGAATCAGG CAGATAAGC CATACAGGCA GATAGACCTC TACCTATTAA  
 -726 ATCGGCTTCT AGCGGCTC CATCTAATG TTCTGGCTGT GGTGTACAGG  
 -676 GGCATAAAT TAGGCATAC CCGAATCGAT AGAATCTACT ATTTTATAT  
 -626 AGAATCAGA ATTCATAGTG TTTGATCAT TTTAATTTT TATATGGCGG  
 -576 GTGGTGGCA ACTGCTTGC GGGGGCAACT CGCTTACCGA TTAGCTTAGG  
 -526 GCTGATATTT AGCTGAATAT CGTCAAGGGA TCGAAGACCA AAGTAGTAAA  
 -476 ACCCGGAG TCACAGCAT CCAAGGCCAA GTCTTTCACG GAGAAACCCC  
 -426 AGGCTCCACA TCACAGCGA AGGACCCACT CTAGGCATCG GAGCCACCAT  
 -376 CCAATTAGAA GCAGCAAGC GAAACAGCCC AGCAAAAGG TCGGCCCGTC  
 -326 GGCCTTTTCT GCACGCTGA TCACGGGCGAG CGATCCACCC AACACCTCC  
 -276 AGAGTCACTA GGGCGGAAA TTTAAGGGA TTAATTTCCA CTCACACACA  
 -226 AATCACAGTC GTCCCGGTA TTGTCCTGCA GAATGCAAT TAACTCTTC  
 -176 TCGCAATCGC TTGGATTCC CCCCCCTAGT CGTAGAGCTT AAAGTAGTTC  
 -126 CTTGTGAT GCGATCTATC ACACATATA AATACTAGCA AGGATGCCA  
 -76 TCGTTGGAG ATAGCAACG ACACATCAC ATCAGCTCT CCCTTCTCTG  
 -25 AACATAAAC CCCACAGAG GCATTT

4 12 24 34 44 54  
 ATGATGCTCGGTGGTCTCTATTTCTGACGCTTCAGGCTCGCGGACCGCTTTG  
 MetMetValalaIrpTrpSerLeuPheLeuTyrGlyLeuGlnValalaIalaProalaLeu  
 64 74 84 94 104 114  
 GCTCAACCGCTCGGACTGGCGATCGCAATTCATTTCTCTCCACGATCGATTT  
 AlaAlaThrProalaAspTrpArgSerGlnSerIleTyrPheLeuLeuThrAspArgPhe  
 124 134  
 GCAACGACGGATGGGTGCAC  
 AlaArgThrAspGlySer

FIG. 2

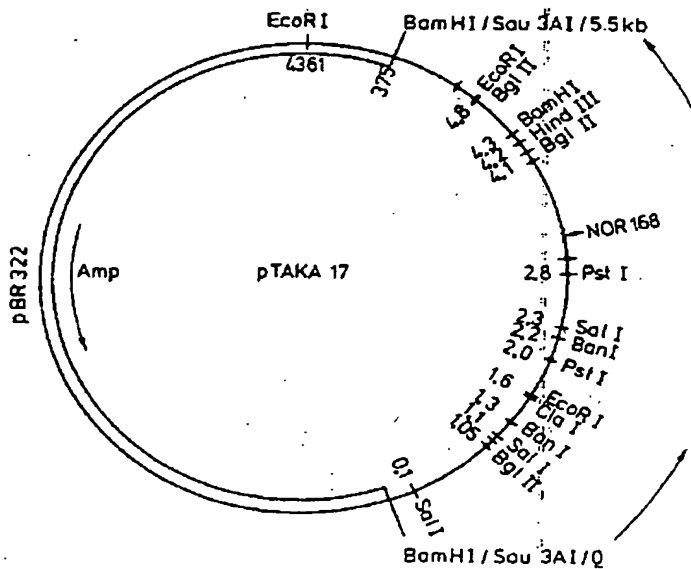


FIG. 3

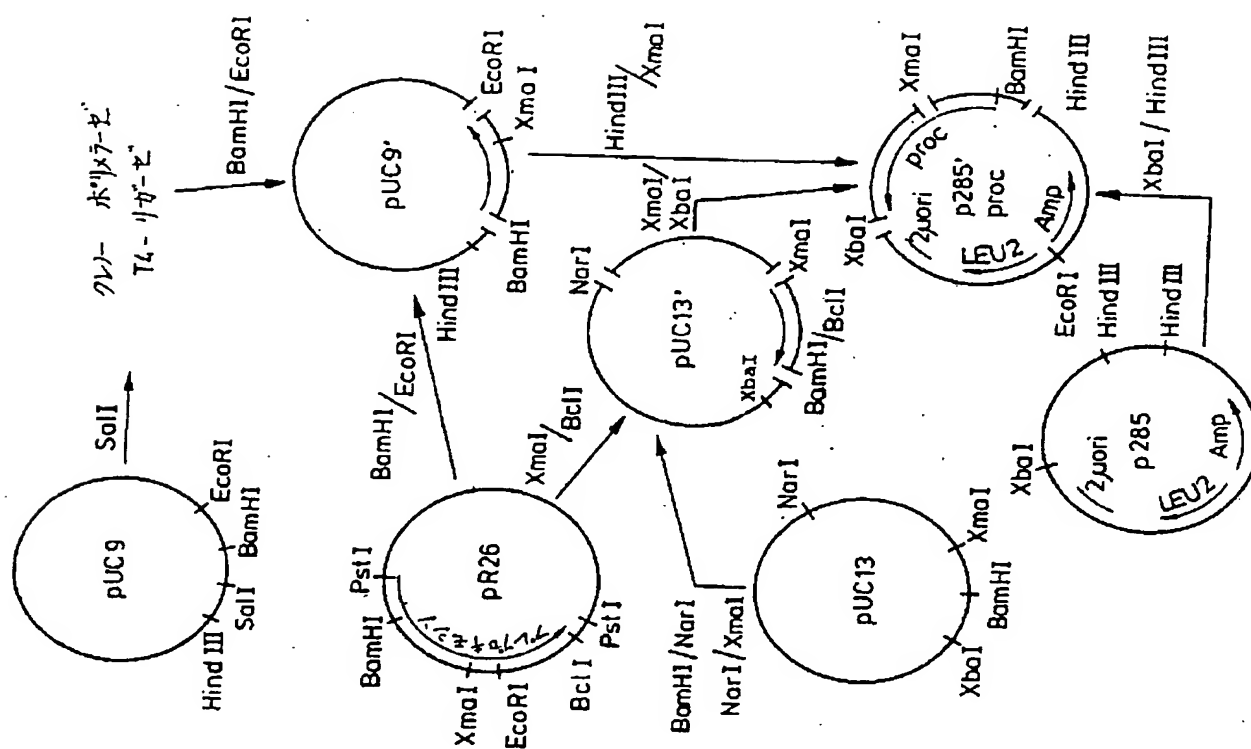


FIG. 4a

ATCAGATTCGACC	ATG CTC TTC TCT CAG ATT ACT TCT GCG ATC CTT TTA	-1	36
	MET LEU PHE SER GLN ILE THR SER ALA ILE LEU LEU		-58
ACA GCG GCT TCT TTG TCG CTT ACC ACT GCT CGC CCG GTA TCC AAG CAA		84	
THR ALA ALA SER LEU SER LEU THR THR ALA ARG PRO VAL SER LYS GLN		-42	
TCC GAG TCC AAG GAC AAG CTT CTG GCG CTT CCT CTC ACC TCG GTG TCC		132	
SER GLU SER LYS ASP LYS LEU LEU ALA LEU PRO LEU THR SER VAL SER		-26	
CGC AAG TTC TCT CAA ACC AAG TTC GGT CAG CAA CAA CTT GCT GAG AAG		180	
ARG LYS PHE SER GLN THR LYS PHE GLY GLN GLN GLN LEU ALA GLU LYS		-10	
CTA GCA GGT CTC AAG CCC TTC TCT GAA GCT GCC GCA GAC GGC TCC GTC		228	
LEU ALA GLY LEU LYS PRO PHE SER GLU ALA ALA ALA ASP GLY SER VAL		7	
GAT ACG CCC GGC TAT TAC GAC TTT GAT CTG GAG GAG TAT GCT ATT CCG		276	
ASP THR PRO GLY TYR TYR ASP PHE ASP LEU GLU GLU TYR ALA ILE PRO		23	
GTC TCC ATT GGT ACT CCT GGT CAA GAC TTT TTG CTC TTG TTC GAC ACT		324	
VAL SER ILE GLY THR PRO GLY GLN ASP PHE LEU LEU LEU PHE ASP THR		39	
GGC AGC TCC GAT ACT TGG GTT CCA CAC AAG GGT TGC ACC AAG TCT GAA		372	
GLY SER SER ASP THR TRP VAL PRO HIS LYS GLY CYS THR LYS SER GLU		55	
GGT TGT GTT GGC AGC CGA TTC TTT GAT CCA TCG GCT TCC TCC ACT TTT		420	
GLY CYS VAL GLY SER ARG PHE PHE ASP PRO SER ALA SER SER THR PHE		71	
AAA GCA ACT AAC TAC AAC CTA AAC ATC ACC TAC GGT ACT GGC GGC GCA		468	
LYS ALA THR ASN TYR ASN LEU ASN ILE THR TYR GLY THR GLY GLY ALA		87	
AAC GGT CTT TAC TTT GAA GAC AGC ATC GCT ATC GGC GAC ATC ACC GTG		516	
ASN GLY LEU TYR PHE GLU ASP SER ILE ALA ILE GLY ASP ILE THR VAL		103	
ACC AAG CAA ATT CTG GCT TAC GTC GAT AAT GTT CCG GGC CCA ACT GCT		564	
THR LYS GLN ILE LEU ALA TYR VAL ASP ASN VAL ARG GLY PRO THR ALA		119	
GAG CAG TCT CCT AAC GCT GAC ATT TTC CTT GAT GGT CTC TTT GGT GCA		612	
GLU GLN SER PRO ASN ALA ASP ILE PHE LEU ASP GLY LEU PHE GLY ALA		135	
CCC TAC CCA GAC AAC ACG GCC ATG GAA GCA GAG TAT GGA TCG ACT TAT		660	
ALA TYR PRO ASP ASN THR ALA MET GLU ALA GLU TYR GLY SER THR TYR		151	



FIG. 4b

AAC ACT GTT CAC GTC AAC CTC TAC AAG CAA GGC TTG ATC TCT TCT CCT 708  
 ASN THR VAL HIS VAL ASN LEU TYR LYS GLN GLY LEU ILE SER SER PRO 167  
 CTT TTC TCG GTC TAC ATG AAC ACT AAC AGC GGC ACT GGA GAG GTC GTC 756  
 LEU PHE SER VAL TYR MET ASN THR ASN SER GLY THR GLY GLU VAL VAL 183  
 TTT GGT GGA GTC AAC AAC ACG CTT CTC GGC GGC GAC ATT GCC TAC ACG 804  
 PHE GLY GLY VAL ASN ASN THR LEU LEU GLY GLY ASP ILE ALA TYR THR 199  
 GAC GTT ATG AGT CGT TAT GGT GGT TAT TAC TTC TGG GAC GCA CCC GTC 852  
 ASP VAL MET SER ARG TYR GLY TYR TYR PHE TRP ASP ALA PRO VAL 215  
 ACA GGT ATC ACC GTC GAT GGA TCT GCT GCT GTC AGG TTC TCG AGA CCC 900  
 THR GLY ILE THR VAL ASP GLY SER ALA ALA VAL ARG PHE SER ARG PRO 231  
 CAA GCA TTC ACC ATC GAT ACT GGC ACC AAC TTT TTC ATT ATG CCC TCA 948  
 GLN ALA PHE THR ILE ASP THR GLY THR ASN PHE PHE ILE MET PRO SER 247  
 AGC GCC GCT TCT AAG ATT GTC AAA GCA GCT CTC CCT GAT GCC ACT GAA 996  
 SER ALA ALA SER LYS ILE VAL LYS ALA ALA LEU PRO ASP ALA THR GLU 263  
 ACC CAG CAG GGC TGG GTT GTT CCT TGC GCT AGC TAC CAG AAC TCC AAG 1044  
 THR GLN GLN GLY TRP VAL VAL PRO CYS ALA SER TYR GLN ASN SER LYS 279  
 TCG ACT ATC AGC ATC GTC ATG CAA AAG TCC GGC TCA AGC AGT GAC ACT 1092  
 SER THR ILE SER ILE VAL MET GLN LYS SER GLY SER SER SER ASP THR 295  
 ATT GAG ATC TCG GTT CCT GTC AGC AAA ATG CTT CTT CCA GTC GAC CAA 1140  
 ILE GLU ILE SER VAL PRO VAL SER LYS MET LEU LEU PRO VAL ASP GLN 311  
 TCG AAC GAG ACT TGC ATG TTT ATC ATT CTT CCC GAC GGT GGT AAC CAG 1188  
 SER ASN GLU THR CYS MET PHE ILE ILE LEU PRO ASP GLY GLY ASN GLN 327  
 TAC ATT GTT GGC AAC TTG TTC CTG CGC TTC TTT GTC AAT GTT TAC GAC 1236  
 TYR ILE VAL GLY ASN LEU PHE LEU ARG PHE PHE VAL ASN VAL TYR ASP 343  
 TTT GGC AAC AAC CGT ATC GGC TTT GCA CCT TTG GCC TCG GCT TAT GAA 1284  
 PHE GLY ASN ASN ARG ILE GLY PHE ALA PRO LEU ALA SER ALA TYR GLU 359  
 AAC GAG TAA AAGGGCACCAATTCTTCTTTAGCTGCTCAGATAACTTTGTAACCTCTCTGA 1343  
 ASN GLU TERM  
 TATACTCTTTATAACCTTTATTTCTCACTTTTAACTGTATTCCAATAC/TTATTTCTT 1402

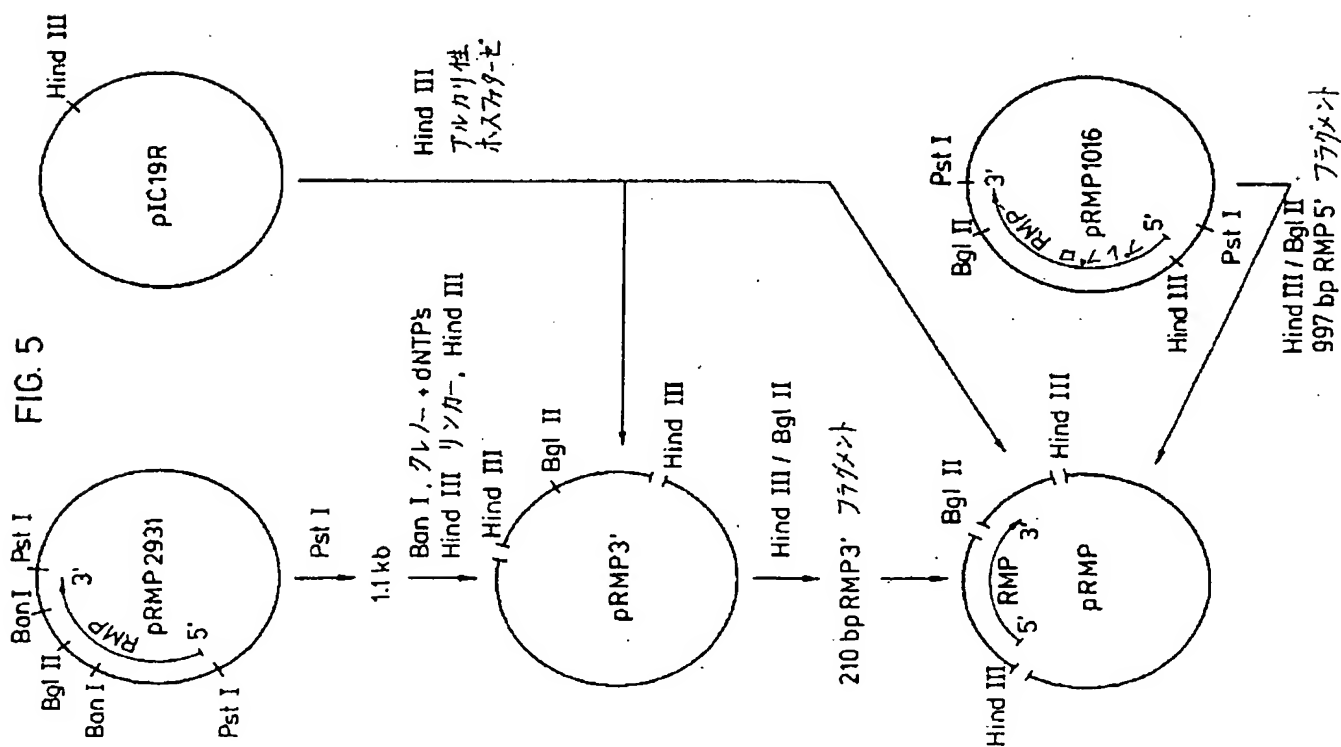


FIG. 6

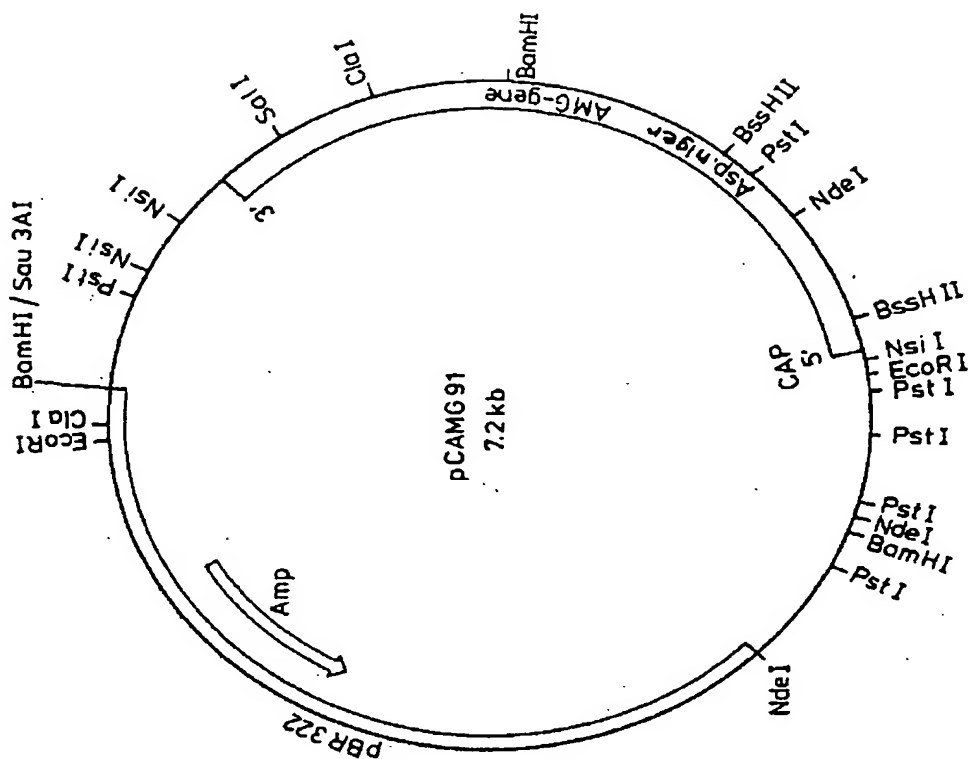


FIG. 7a

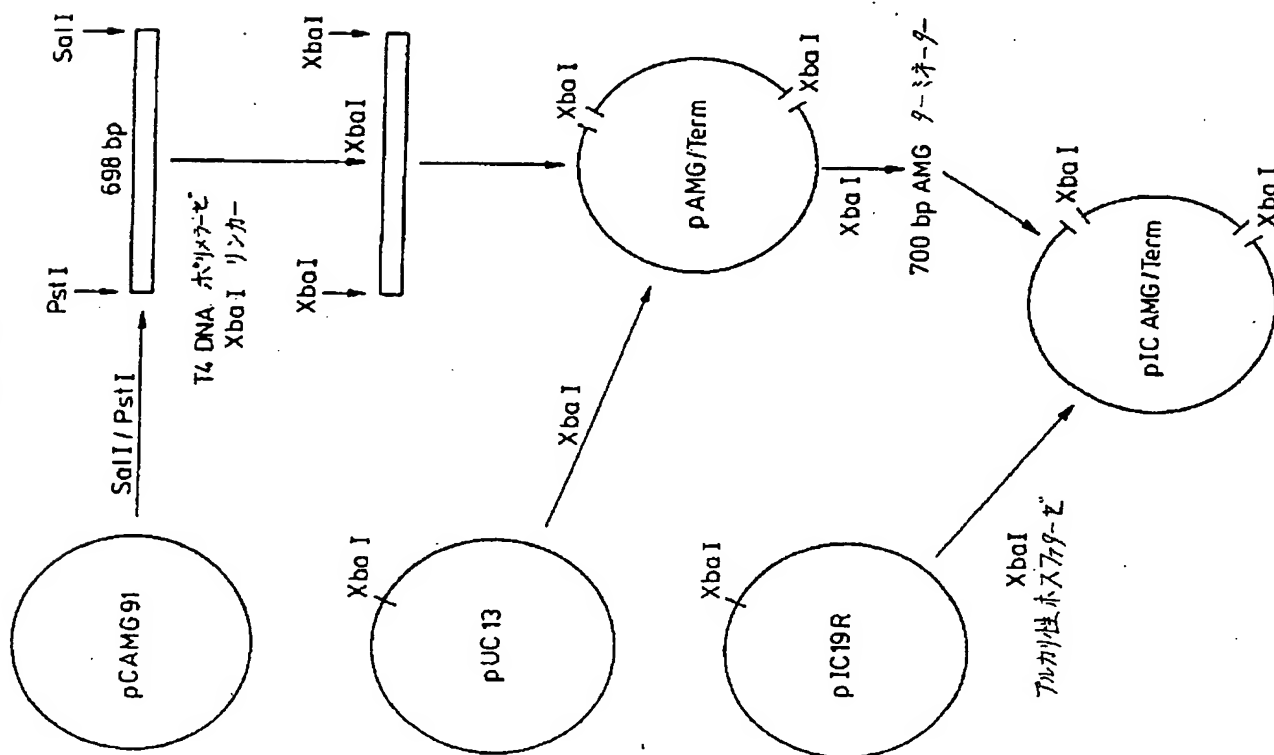


FIG. 7b

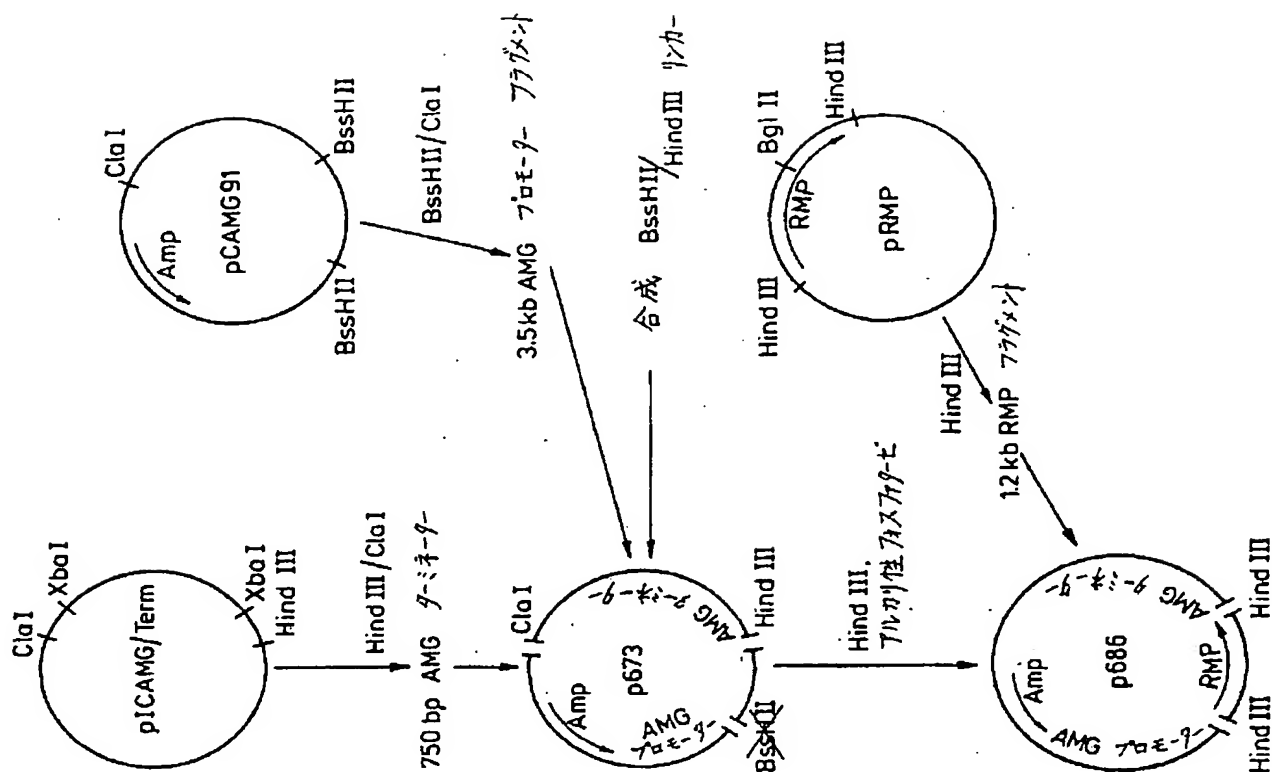


FIG. 8

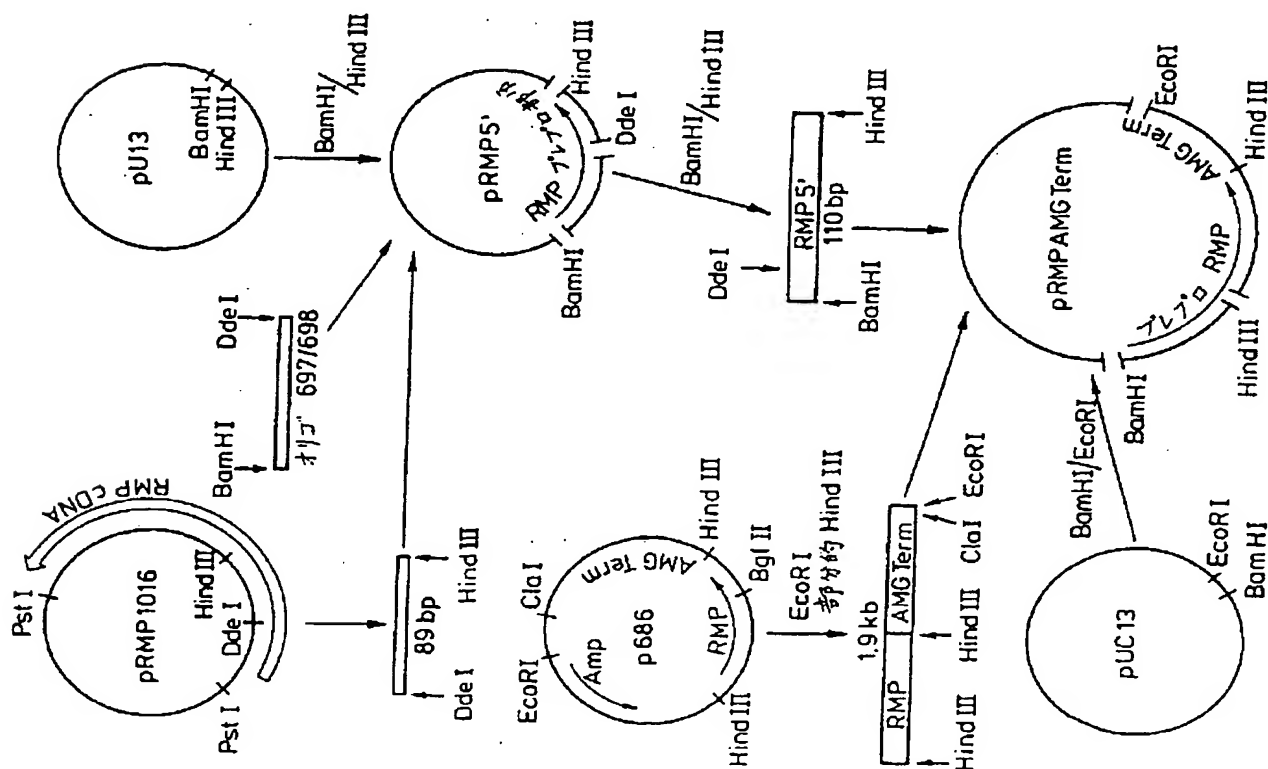


FIG. 9a

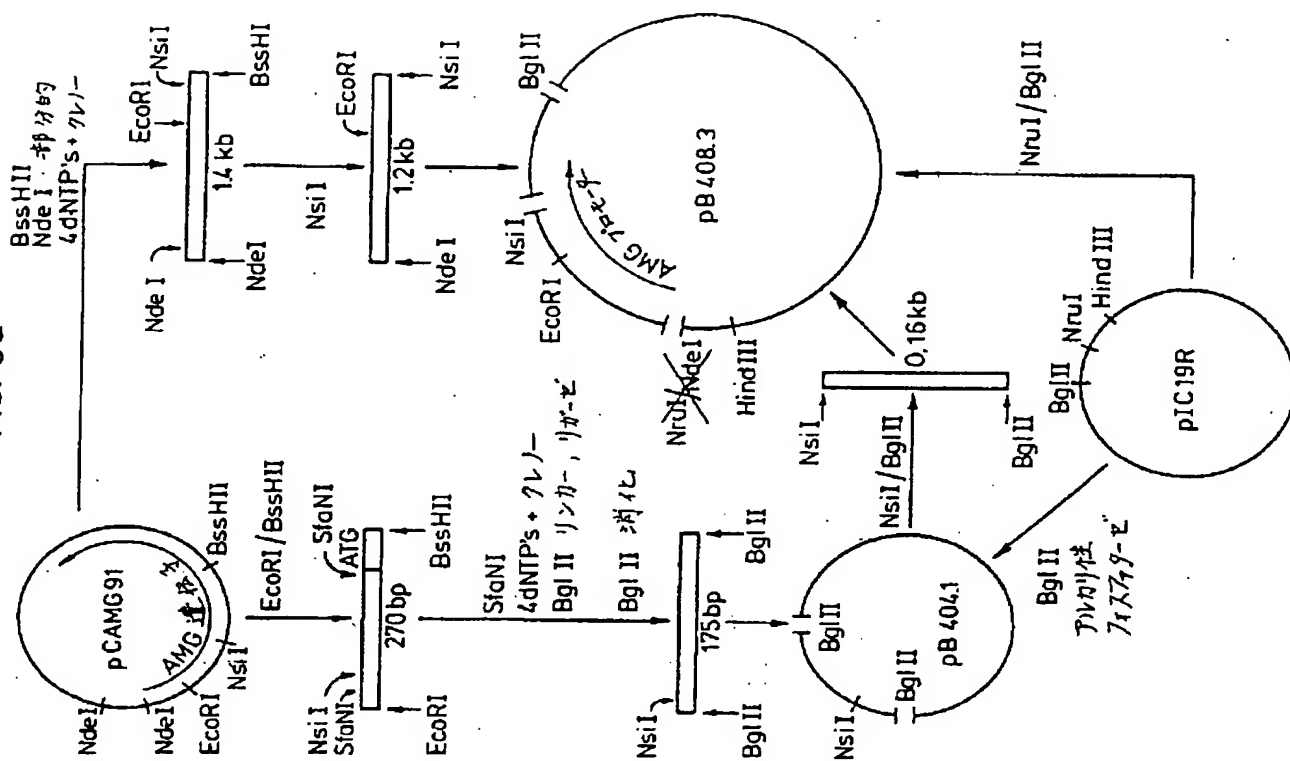


FIG. 9b

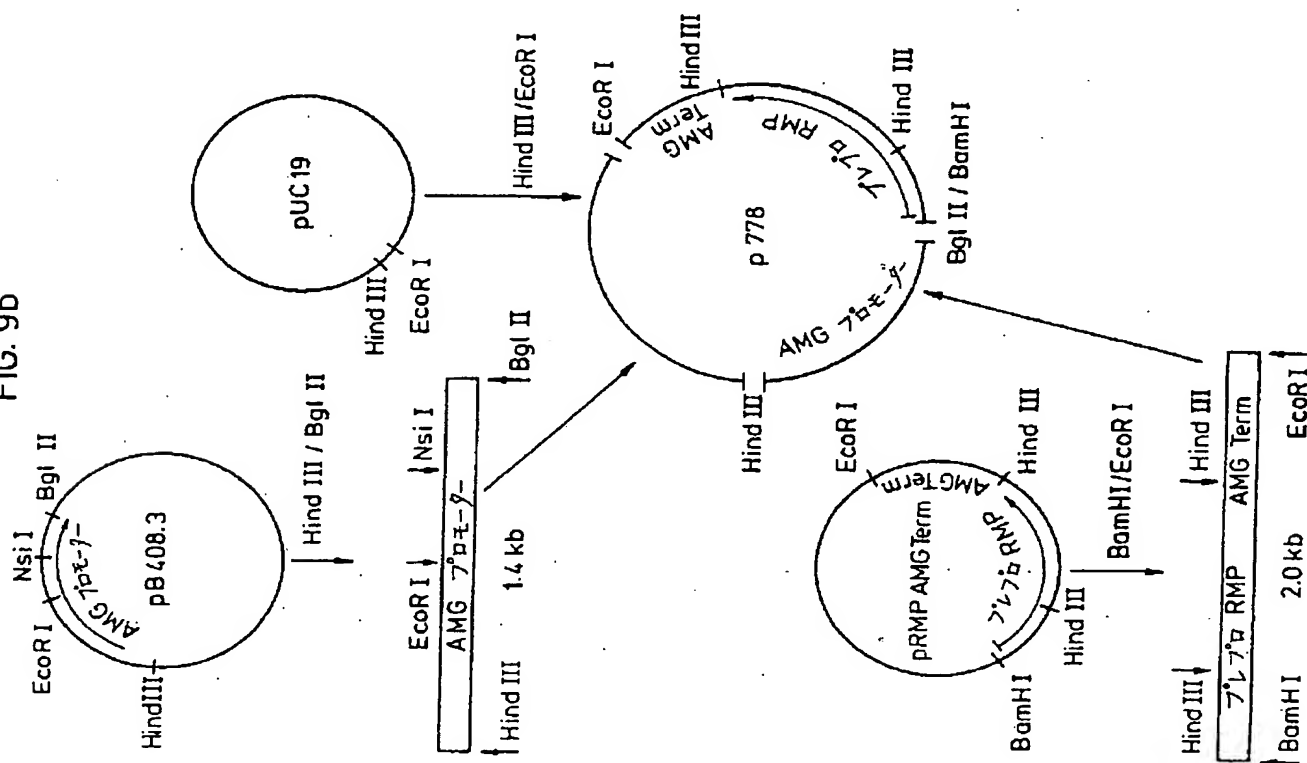
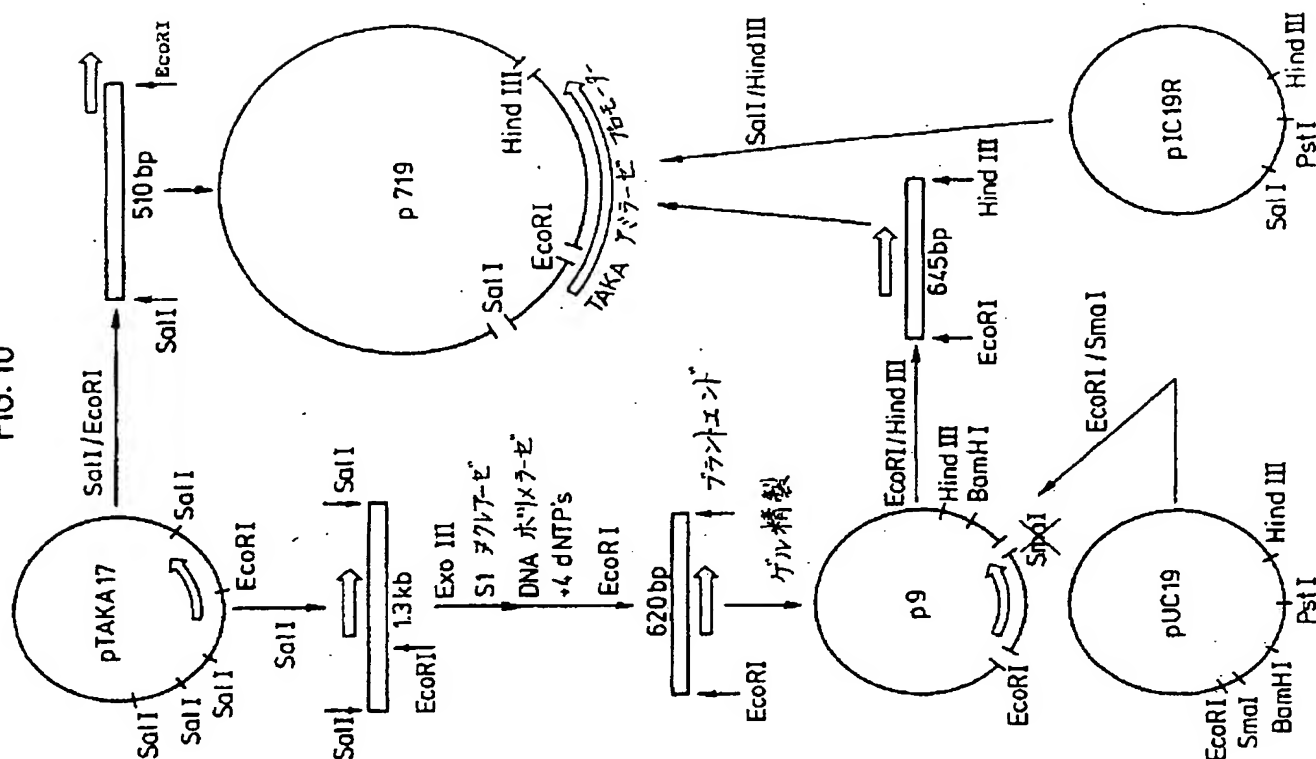


FIG. 10



**FIG. 11**

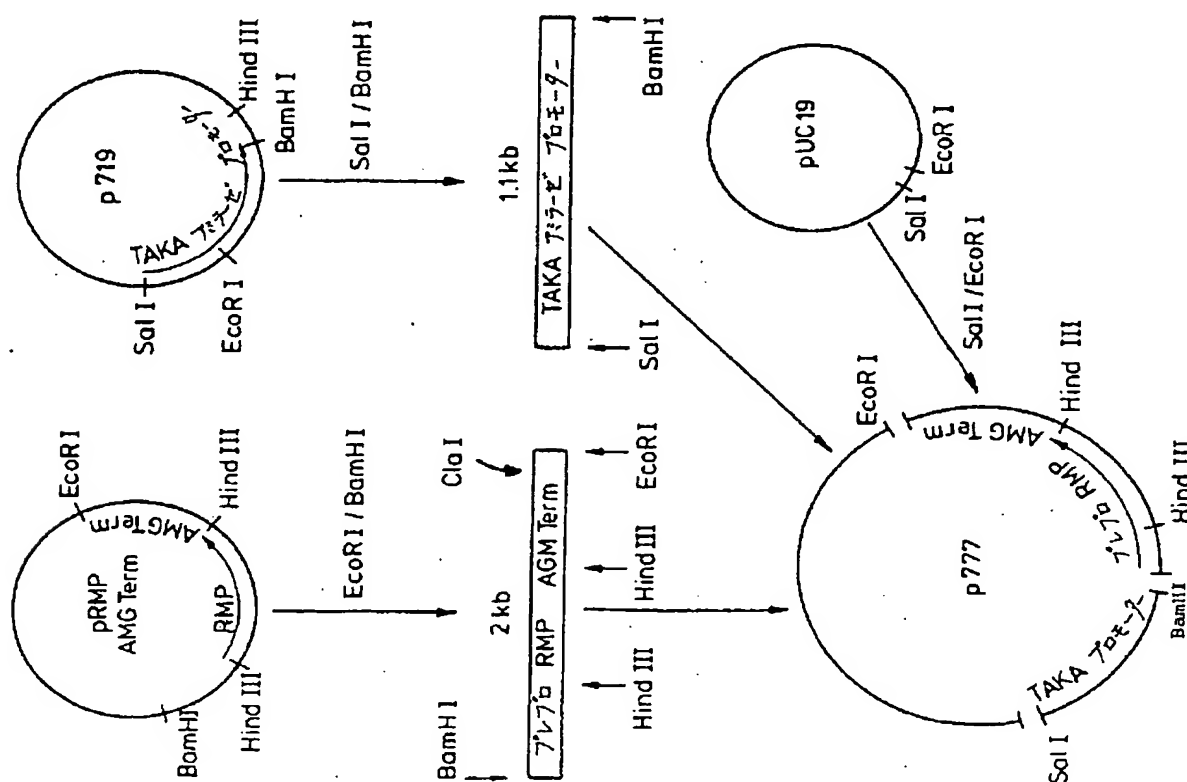


FIG. 12

ATCAGATC ATG GTT CTC AMG CAG GGT GCA AAC TAT CTG GGC TTT CTG ATT GTA TTC TTC 51  
 MET VAL LEU LYS GLN ARG ALA ASN TYR LEU GLY PHE LEU ILE VAL PHE PHE -78  
 ACG GCG TTC CTG GTC GAA GCG GTG CCA ATC AUG ACA CAA TCA AAC ASC ACS GTG GAT AGT 111  
 THR ALA PHE LEU VAL GLU ALA VAL PRO ILE LYS ARG GLN SER ASN SER THR VAL ASP SER -58  
 CTG CCA CCC CTC ATC CCC TCT CGA ACC TCG GCA CTT TCA TCA CCA AGC ACA ACC GAC 171  
 LEU PRO PRO LEU ILE PRO SER ARG THR SER ALA PRO SER SER PRO SER THR THR ASP -38  
 CTT GAA GCT CCA GGC ATG AGT CCC AAT GGA CCG CTG CCC TCG GAT GTA GAG ACT AAA TAT 231  
 PRO GLU ALA PRO ALA MET SER ARG ASN GLY PRO LEU PRO SER ASP VAL GLU THR LYS TYR -18  
 GGC ATG GCT TTG AAT GCT ACT TCC TAT CCG GAT TCT GTG GTC CAA GCA ATG AGC ATT GAT 291  
 GLY MET ALA LEU ASN ALA THR SER TYR PRO ASP SER VAL VAL GLN ALA MET SER ILE ASP 3  
 GGT GGT ATC CCG GCT GCG ACC TCG CAA GAA ATC AAT GAA TTG ACT TAT TAC ACT ACA CTA 351  
 GLY GLY ILE ARG ALA ALA THR SER GLN GLU ILE ASN GLU LEU THR TYR THR THR LEU 23  
 TCT GCG AAC TCG TAC TCG CCG ACT GTT ATT CTT GGA GCT ACC TGG GAC TGT ATC CAC TGT 411  
 SER ALA ASN SER TYR CYS ARG THR VAL ILE PRO GLY ALA THR TRP ASP CYS ILE HIS CYS 43  
 GAT GCA ACG GAG GAT CTC AMG ATT ATC AMG ACT TGG AGC CTC ATC TAT GAT ACA AAT 471  
 ASP ALA THR GLU ASP LEU LYS ILE LYS THR TRP SER THR LEU ILE TYR ASP THR ASN 53  
 GCA ATG GTT GCA GGT GGT GAC ACC GAA AAA ACT ATC TAT ATC GTT TTC CCA GGT TCG AGC 531  
 ALA MET VAL ALA ARG GLY ASP SER GLU LYS THR ILE TYR ILE VAL PHE ARG GLY SER SER 83  
 TCT ATC CCG AAC TGG ATT GCT GAT CTC ACC TTT GTG CCA GTT TCA TAT CTT CCG GTC AGT 591  
 SER ILE ARG ASN TRP ILE ALA ASP LEU THR PHE VAL PRO VAL SER TYR PRO VAL SER 103  
 GGT ACA AAA GTA CAC AAG GGA TTC CTG GAC ACT TAC GGG GAA GTT CAA AAC CAG CTT GTT 651  
 GLY THR LYS VAL HIS LYS GLY PHE LEU ASP SER TYR GLY GLU VAL GLN ASN GLU LEU VAL 123  
 GCT ACT GTT CTT GAT CAA TTC AAG CAA TAT CCA AGC TAC AAG GTT GCT GTT ACA GGT CAC 711  
 ALA THR VAL LEU ASP GLN PHE LYS GLN TYR PRO SER TYR LYS VAL ALA VAL THR GLY HIS 143  
 TCA CTC GGT GGT GCT ACT GCG TTG CTT TCG GCG CTC GGT CTC TAT CA: CCA GAA GAA GGA 771  
 SER LEU GLY GLY ALA THR ALA LEU LEU CYS ALA LEU GLY LEU TYR GLN ARG GLU GLY GLY 163  
 CTC TCA TCG AGC AAC TTG TTC CTT TAC ACT CAA GGT CAA CCA CCG GTA GGC GAC CTT GCC 831  
 LEU SER SER SER ASN LEU PHE LEU TYR THR GLN GLY GLN PRO ARG VAL GLY ASP PRO ALA 183  
 TTT GCG AAC TAC GTT GTT AGC ACC GCG ATT CTT TAC AGC CCG CCG AGT AAT GAA CCA GAT 891  
 PHE ALA ASN TYR VAL VAL SER THR GLY ILE PRO TYR ARG THR VAL ASN GLU ARG ASP 203  
 ATC GTT CTT CAT CTT CCA CTT GCT GCT TTT GGT TTT CTC CAC GCT GCG GAG GAT TAT TGG 951  
 ILE VAL PRO HIS LEU PRO PRO ALA ALA PHE GLY PHE LEU HIS ALA GLY GLU TYR TRP 223  
 ATT ACT GAC AAT ACC CCA GAG ACT GTT CAG GTC TGC ACA AGC GAT CTG GAA ACC TCT GAT 1011  
 ILE THR ASP ASN SER PRO GLU THR VAL GLN VAL CYS THR SER ASP LEU GLU THR SER ASP 243  
 TCG TCT AAC AGC ATT GTT CCC TTC ACA ACT GTT CTT GAC CAT CTC TCG TAC TTT GGT ATC 1071  
 CYS SER ASN SER ILE VAL PRO PHE THR SER VAL LEU ASP HIS LEU SER TYR PHE GLY ILE 263  
 AAC ACA GCG CTC TGT ACT TAA GAAATACCAAGTATACGATATGAGGAGTAGTATTTTACGAGAGATT 1131  
 ASN THR GLY LEU CYS THR TERH

TATATGATTAACAAATATATATATATATACGCTGCGGAGAACCTGTATT POLYA

FIG. 13a

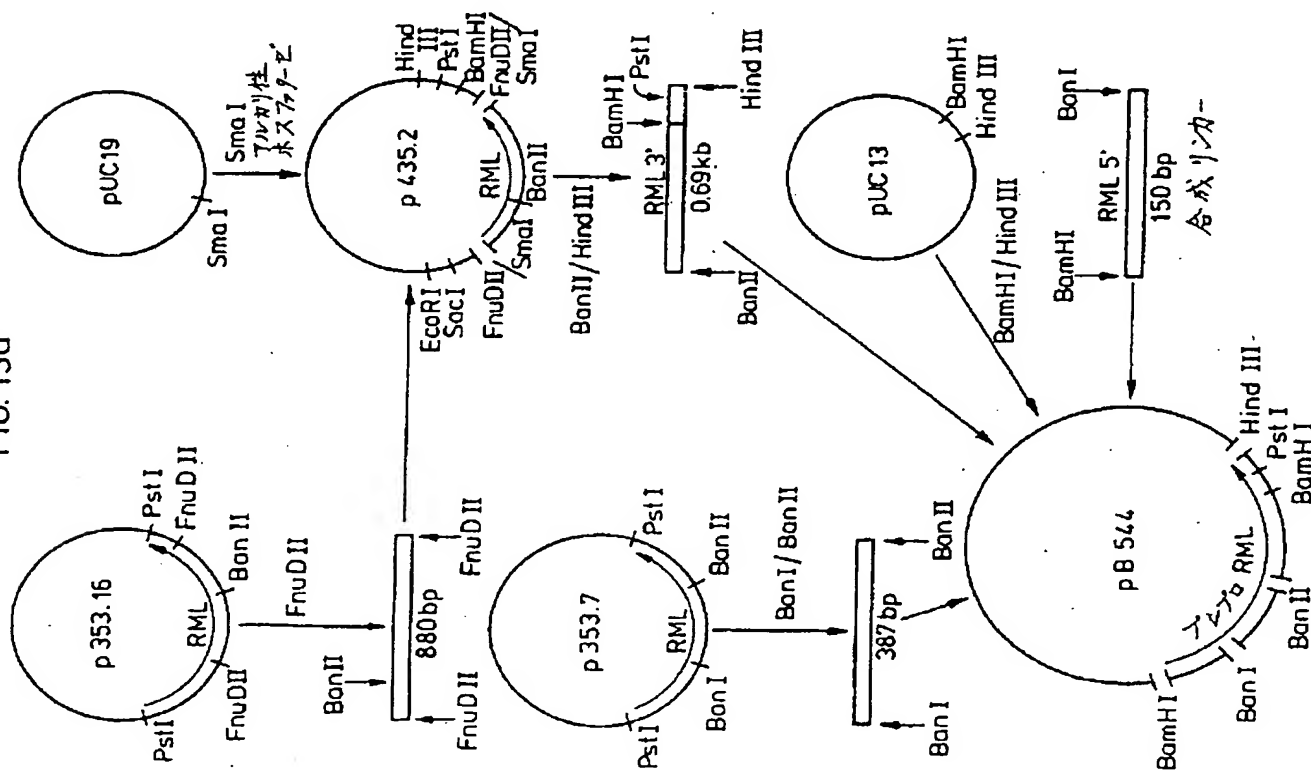


FIG. 13b

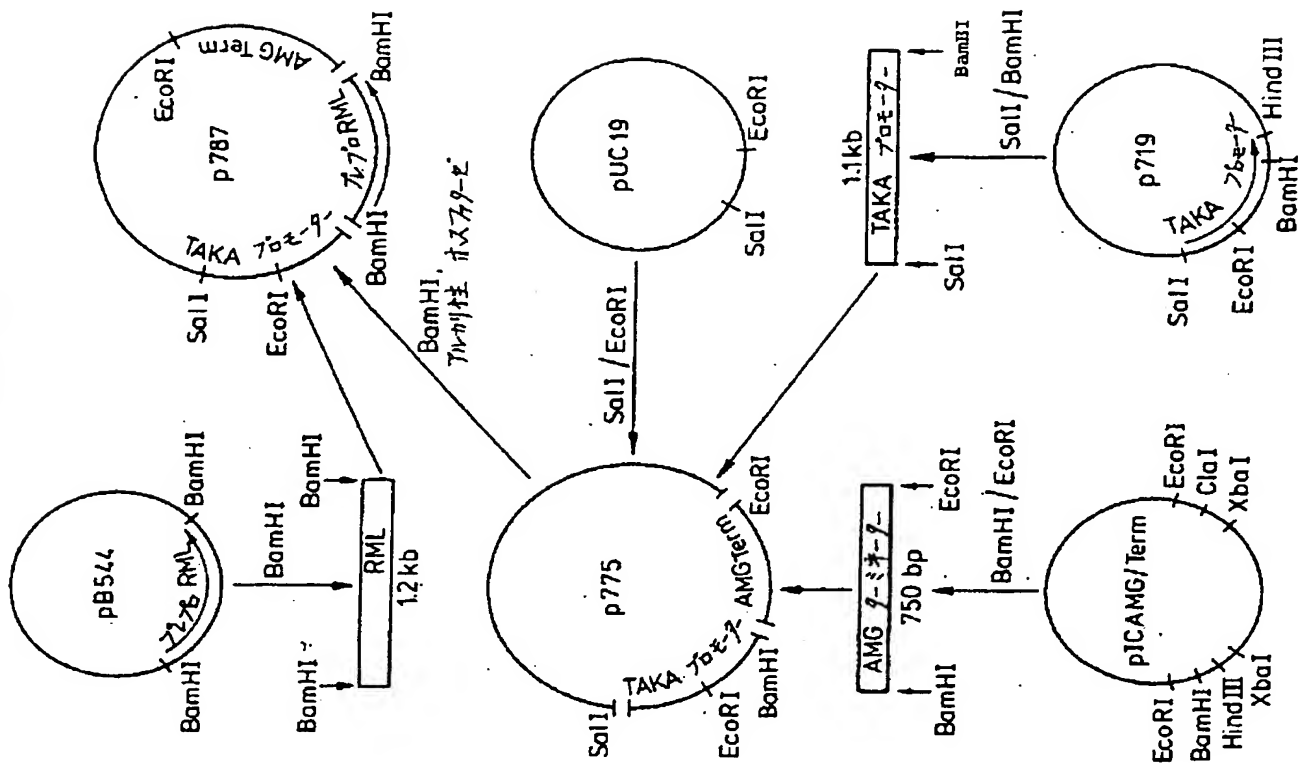


FIG. 14

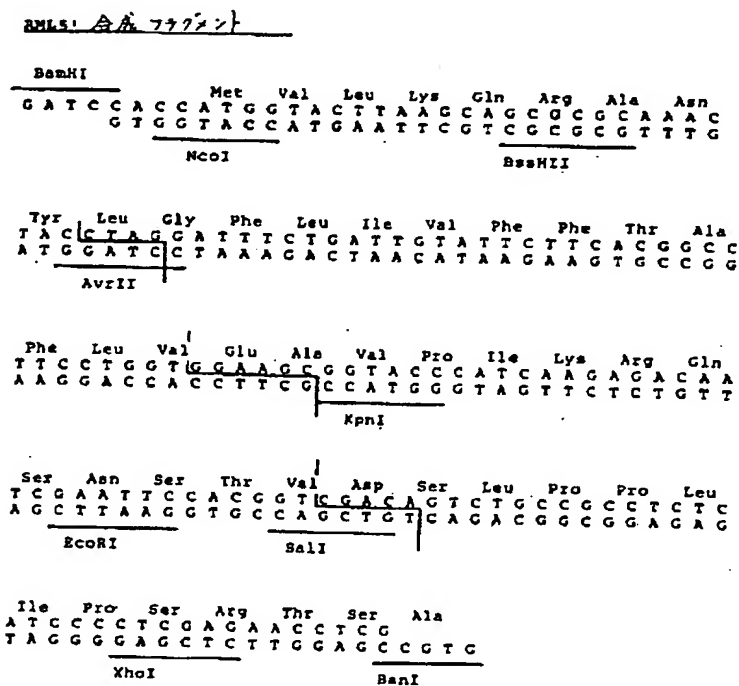
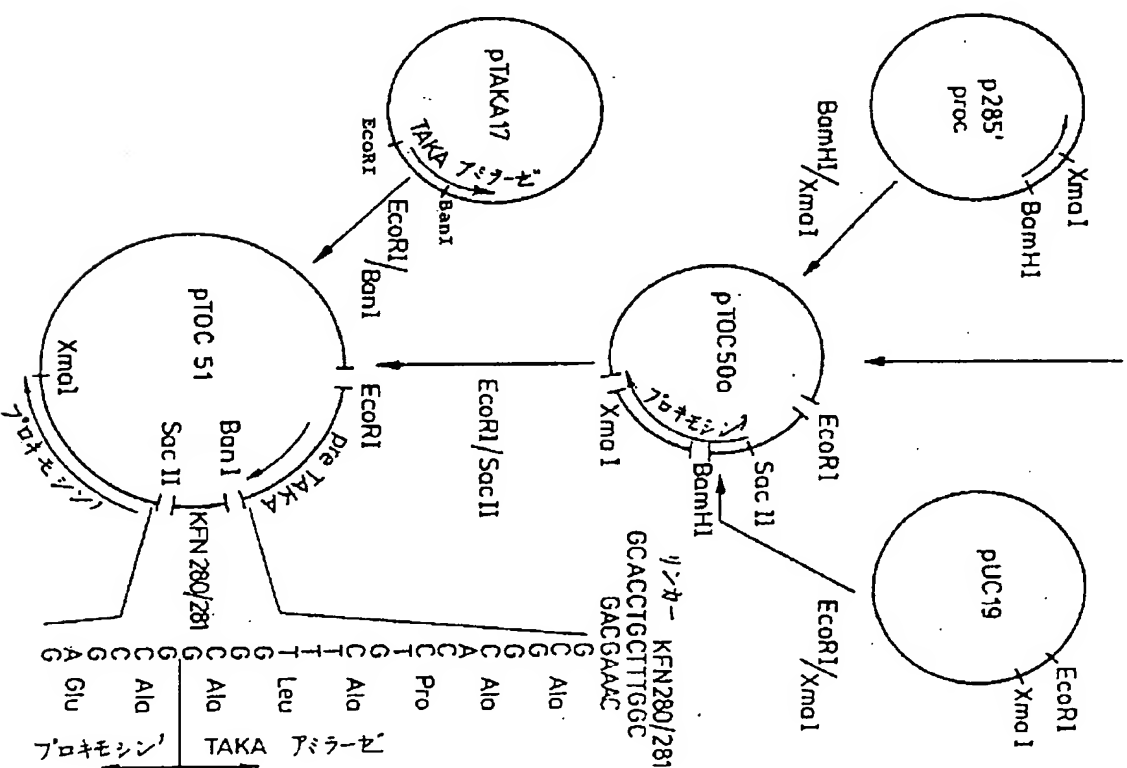


FIG. 150



AATTCAGCTGCCCCGGCCGGAGATCACCAG  
 GGTCGACGGCCCGGCTCTAGTGGTCTAG  
 (合成才リヲ<sup>7</sup>-)



手 続 補 正 書 (方式)

昭和62年5月//日

特許庁長官 黒 田 明 雄 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第60276号

2. 発明の名称

アスペルギルス オリザにおけるタンパク生成物の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 ノボ インダストリ アクティーゼルスカブ

4. 代 理 人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (6579) 青 木 朗

(外4名)

5. 補正命令の日付

自 発 補 正

6. 補正の対象

(1) 明 細 書

(2) 原寄託についての受託証の写

7. 補正の内容

(1) 明細書の浄書 (内容に変更なし)

(2) 別紙の通り

8. 添付書類の目録

(1) 浄書明細書

1通

(2) 原寄託についての受託証  
の写及び訳文

各1通



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**